

Expression, Reinigung und biophysikalische Charakterisierung verschiedener Hydrolasen des Sphingolipid-Stoffwechsels

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)
im Fach Chemie
eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Humboldt-Universität zu Berlin
von

Dipl. Chem. Susanne Ficht-Redmer, Redmer

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin
Prof. Dr. Jan-Hendrik Olbertz

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
Prof. Dr. Elmar Kulke

Gutachter:

1. Prof. Dr. rer. nat. Christoph Arenz
2. Prof. Dr. rer. nat. Christian Hackenberger

Tag der mündlichen Prüfung: 13.07.2013

Die vorliegende Arbeit wurde im Arbeitskreis von Prof. Dr. Christoph Arenz am Institut für Chemie der Humboldt- Universität zu Berlin in der Zeit von Mai 2008 bis Juli 2013 angefertigt.

Inhaltsverzeichnis

1	Stand der Forschung	1
1.1	Sphingolipide im Fokus der Wissenschaft	1
1.1.1	Funktion und Biosynthese der Sphingolipide	2
1.1.2	Katabolismus der Sphingolipide	6
1.1.3	Sphingolipide in der Signaltransduktion	11
1.2	Enzyme des lysosomalen Stoffwechsels	15
1.2.1	Biosynthese und Transport lysosomaler Enzyme	15
1.2.2	Die saure Sphingomyelinase	16
1.2.3	Weitere Sphingomyelinasen und lysosomale Hydrolasen	26
2	Zielsetzung	29
3	Ergebnisse und Diskussion	31
3.1	Expression der sauren Sphingomyelinase und varianter Formen	31
3.2	Reinigung der sauren Sphingomyelinase und varianter Formen	32
3.3	Zellfreie Expression der sauren Sphingomyelinase	38
3.4	Enzymkinetik im mizellaren Sphingomyelinase-Assay	39
3.5	Liposomaler Sphingomyelinase-Assay	42
3.6	Bestimmung der Restenzymaktivitäten in humanen ASM-defizienten Fibroblastenzellen	44
3.7	Reinigung weiterer Hydrolasen des Sphingolipid-Katabolismus	48
3.8	IR-Spektroskopie der sauren Sphingomyelinase und varianter Formen	49
3.9	Oberflächenplasmonenresonanz-Experimente	54
4	Zusammenfassung	59
5	Ausblick	63
6	Material und Methoden	65
6.1	Bezugsquellen	65
6.1.1	Geräte	65
6.1.2	Verbrauchsmaterial	67
6.1.3	Chromatographiemedien und -säulen	67
6.1.4	Chemikalien	68
6.1.5	Puffer und Standardreagenzien	69

6.1.6	Enzyme und Kits	70
6.1.7	Standardmedien für Zellkultur	71
6.1.8	Plasmide und Antikörper	71
6.2	DNA-basierte Methoden	71
6.2.1	Allgemeine Kultivierungsbedingungen für Bakterienstämme .	71
6.2.2	Klonierung der Expressionsvektoren für die humane saure Sphingomyelinase und Varianten	72
6.2.3	Klonierung des Expressionsvektors für die humane saure Ceramidase	78
6.3	Protein-basierte Methoden	80
6.3.1	Kultivierung von <i>Spodoptera frugiperda</i> 9 Insektenzellen	80
6.3.2	Expression und Reinigung der humanen sauren Sphingomyelinase	83
6.3.3	Expression und Reinigung der humanen sauren Ceramidase . .	88
6.3.4	Anreicherung der neutralen Sphingomyelinase aus Kalbshirn .	90
6.3.5	Expression der neutralen Sphingomyelinase in <i>E. coli</i> Rosetta	92
6.3.6	Proteinanalytik	93
6.3.7	Bestimmung der Aktivität von Proteinen	96
6.4	Allgemeine Techniken	102
6.4.1	Generelle Kultivierung von Säugerzellen	103
6.4.2	Herstellung von Zelllysaten	105
6.4.3	Zellproliferationsassay mit WST 1	106
6.4.4	Zellulärer DNA Fragmentations-ELISA	106
A	Appendix	109
A.1	Vektorkarten der verwendeten Plasmide	110
A.2	Schematische Darstellung des Bac-to-Bac-Expressionssystems	113
A.3	Chromatogramme der einzelnen Proteinreinigungsstufen	114
A.4	Spektren der thermischen IR-Messungen	117
	Abbildungsverzeichnis	134
	Tabellenverzeichnis	136
	Abkürzungsverzeichnis	137

Abstract

Sphingolipids are an important class of lipid molecules. Beyond their structural role, they also serve as bioactive signalling entities. Sphingolipid metabolites like ceramide, sphingosine and sphingosine-1-phosphate are involved in many cellular processes including differentiation, apoptosis, proliferation, inflammation and intracellular trafficking. In this context, sphingomyelinases are of special interest. The largest part of sphingomyelin is converted by the acid sphingomyelinase. This enzyme was shown to be involved in sphingomyelin hydrolysis in three different settings- the outer leaflet of the plasma membrane, the endolysosomal compartment, and lipoproteins. By this action, the bioactive lipid ceramide is produced, which has pleiotropic signalling properties. Dysfunction of the acid sphingomyelinase results in Niemann-Pick disease, a genetic disorder with massive accumulation of sphingomyelin in various organs. The present work focuses on the expression and purification of recombinant human acid sphingomyelinase and selectively chosen variant forms of the enzyme, representing prominent Niemann-Pick disease types. Subsequently the biochemical parameters of all obtained enzymes were determined by Michaelis-Menten kinetics. In order to assess the stimulation of sphingolipid metabolism metabolically radiolabeled (NPA -/-) cells were treated with the recombinant enzymes. As a result the concentration of stored sphingomyelin in these cells was significantly reduced, and correlated well with the enzymatic activity. Additionally this was carried out with the lysosomal protease inhibitor Leupeptin, leading to once again reduced levels of stored sphingomyelin, and indicating a relationship between changed biochemical properties of the mutant enzymes and proteolytic degradation in the lysosomal compartment of Niemann-Pick patients. Based on FT-IR spectroscopy, structural components of the acid sphingomyelinase and its variants, such as α -helix, β -sheet and turns, were determined and quantified. The results suggested different folding patterns, thereby offering an explanation for reduced stability and activity of the acid sphingomyelinase variants.

Furthermore SPR-experiments were performed to analyse the biomolecular interaction of immobilized acid sphingomyelinase and the anticancer agent siramesine. Siramesine acts as an inhibitor on acid sphingomyelinase, thereby triggering cancer-specific lysosomal cell death. In this context the human acid sphingomyelinase was identified as a target for cancer therapy.

1 Stand der Forschung

1.1 Sphingolipide im Fokus der Wissenschaft

In den letzten 20 Jahren ist das wissenschaftliche Interesse an Lipiden, insbesondere den bioaktiven Lipiden, neu entflammt. Der Grund hierfür lag in der Erkenntnis, dass die Rolle von Lipiden nicht allein auf Energiestoffwechsel und Bildung von Membranstrukturen beschränkt ist. Diese Wende wurde mit der Entdeckung eingeläutet, dass das Lipid Diacylglycerol in der Lage ist die Proteinkinase C direkt zu aktivieren und somit eine Regulationsfunktion bei Signaltransduktionsprozessen ausüben kann. Weitere Studien zeigten, welche Rolle Arachidonsäure-Metaboliten als Lipidsignalmoleküle bei Entzündungsprozessen in Zellen spielen. Als erstes Sphingolipid wurde Sphingosin identifiziert, es nimmt eine regulierende Funktion bei der Endocytose und Apoptose (programmierter Zelltod) sowie im Zellzyklus allgemein ein. Darüber hinaus wurde den Sphingolipiden Ceramid und Sphingosin-1-Phosphat große Aufmerksamkeit gewidmet. Ceramid ist bei vielen zellulären Stressantworten von Bedeutung, z.B. Apoptose und Alterungsprozessen von Zellen, Sphingosin-1-Phosphat hingegen reguliert Zell-Migration sowie Entzündungs- und Überlebensmechanismen von Zellen. Weitere wichtige Sphingolipide sind z.B. Ceramid-1-Phosphat, welches unter anderem den vesikulären Transport moduliert, oder Glucosylceramid, dem eine bedeutende Rolle bei dem Golgi-Apparat nachfolgenden Transportprozessen zugeschrieben wird. Sphingolipide rückten zusätzlich in den Fokus interdisziplinärer Forschung, als man erkannte, dass ein gestörter Katabolismus dieser Substanzklasse Sphingolipidspeicherkrankheiten, sogenannte Sphingolipidosen, hervorruft. Zahlreiche Enzyme des Sphingolipid-Katabolismus wurden dazu charakterisiert und Mutationen, die zu Defekten der beteiligten Enzyme führten, identifiziert und den entsprechenden Krankheitsbildern zugeordnet. Eine Vielzahl lysosomaler Speicherkrankheiten wurde benannt, unter anderem die Niemann-Pick-Krankheit, die auf einen Defekt im Enzym

saure Sphingomyelinase zurückzuführen ist. Mit Ausnahme der adulten Form der Gaucher-Krankheit ist eine kausale Therapie von Sphingolipidspeicherkrankheiten zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht möglich.

1.1.1 Funktion und Biosynthese der Sphingolipide

Biologische Membranen sind aus Lipiddoppelschichten aufgebaut, wobei die cytosolische und die nichtcytosolische Schicht eine unterschiedliche Zusammensetzung aufweisen können. Sphingolipide und die daraus abgeleiteten komplexeren Glycosphingolipide sind hauptsächlich in der nach außen gewandten Schicht der Plasmamembran vorzufinden [1]. Das Sphingolipid Sphingomyelin kann dabei als struktureller Bestandteil der Plasmamembran einen Anteil von bis zu 25% erreichen. Zusammen mit Cholesterol bilden Sphingolipide Mikrodomänen innerhalb der Zellmembranen, die als *lipid rafts* bezeichnet werden [2, 3]. Sphingolipide weisen eine große Heterogenität hinsichtlich der Alkylkettenlänge sowie des Sättigungs- und Hydroxyierungsgrads innerhalb der Stoffklasse auf. Ein grundlegendes Strukturelement, welches in den allermeisten Sphingolipiden vorkommt, ist das Ceramid, bestehend aus dem langkettigen Aminoalkohol D-*erythro*-Sphingosin, dessen Aminofunktion mit einer Fettsäure acyliert ist. Dieser hydrophobe Rest sorgt für eine Verankerung des Sphingolipids in der Membran. Die hydrophile Oligosaccharid-Kopfgruppe der Glycosphingolipide ragt dagegen in den extrazellulären Raum hinein. Gemeinsam mit den Glycoproteinen und den Glycosaminoglycanen bilden die hydrophilen Kopfgruppen der Sphingolipide die Glycocalix eukaryontischer Zellen. Im Sphingolipid Sphingomyelin liegt das Grundgerüst Ceramid mit der hydrophilen Kopfgruppe Phosphorylcholin verknüpft vor.

Über die exakte Funktion einzelner Sphingolipide *in vivo* ist bisher wenig bekannt. Zahlreiche Studien legen ihre Beteiligung an biologischen Vorgängen nahe, oftmals fehlen jedoch eindeutige Beweise für die entsprechenden Funktionsmechanismen. Unstrittig ist die Beteiligung der Sphingolipide am Aufbau der Wasserpermeabilitätsbarriere der menschlichen Haut. Die hier beteiligten Ceramide unterscheiden sich strukturell von den üblicherweise vorkommenden Membran-Ankern durch ihre ungewöhnlich langen Fettsäurereste sowie Sphingoidbasen, die an verschiedenen Positionen hydroxyliert sein können. Einzelne Glycosphingolipide fungieren als Blutgruppen-Antigene, außerdem sind Sphingolipide an Signaltransduktionsprozessen innerhalb

des Immunsystems beteiligt [4].

Die *de-novo*-Biosynthese der Glycosphingolipide [5] erfolgt in denselben Zellkompartimenten in denen auch die Biosynthese der Glycoproteine stattfindet und ist an den vesikulären Transport der wachsenden Lipidmoleküle gekoppelt, der über die Zisternen des Golgi-Apparates zur Plasmamembran führt. Die ersten vier Reaktionsschritte der Sphingolipid-Biosynthese finden an der cytosolischen Membranseite des Endoplasmatischen Retikulums (ER) unter Mitwirkung membrangebundener Enzyme statt [6, 7]. Startpunkt ist die Kondensation der Aminosäure L-Serin mit einer Coenzym-A-aktivierten Fettsäure zu 3-Ketosphingarin [8–10]. Diese Reaktion wird durch das Pyridoxalphosphat-abhängige Enzym Serin-Palmitoyltransferase katalysiert und stellt den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt des Stoffwechselweges dar. Im nächsten Schritt wird 3-Ketosphingarin von der NADPH-abhängigen 3-Ketosphingarin-Reduktase zu D-*erythro*-Sphingarin reduziert [9]. Nachfolgend entsteht durch Acylierung der Aminogruppe, katalysiert vom Enzym Sphingarin-N-Acyltransferase, Dihydroceramid [11, 12], welches anschließend eine Dehydrierung durch das Enzym Dihydroceramid-Desaturase erfährt [13–15]. Das gebildete Ceramid ist die gemeinsame Vorstufe von Glycosphingolipiden und Sphingomyelin und wird durch Vesikelfluss (oder Protein-vermittelten Transport) zum Golgi-Kompartiment weitergeleitet. Die Übertragung der Phosphorylcholin-Kopfgruppe von Phosphatidylcholin auf Ceramid ergibt schließlich Sphingomyelin und wird durch die Sphingomyelin-Synthase im Lumen des Golgi-Apparates katalysiert [16].

Die Bildung von Glucosylceramid mit Hilfe der Glucosyltransferase läuft dagegen auf der cytosolischen Seite des Golgi-Apparates ab [17, 18]. Nach Membran-Translokation von Glucosylceramid auf die luminale Seite des Golgi-Apparates entstehen durch sequentielle Einführung weiterer Zuckereinheiten die komplexen Glycosphingolipide, insbesondere die Ganglioside [19–21]. Infolgedessen sind die Glycanketten membrangebundener Glycosphingolipide anticytosolisch orientiert. Mittels vesikulärem Transport gelangen die gebildeten Sphingolipide und Glycosphingolipide letztendlich zur Plasmamembran.

Die Abbildung Abb. 1.1 zeigt die ersten vier beschriebenen Reaktionsschritte schematisch, in Abbildung Abb. 1.2 ist der letzte Reaktionsschritt vom Ceramid zum Sphingomyelin dargestellt.

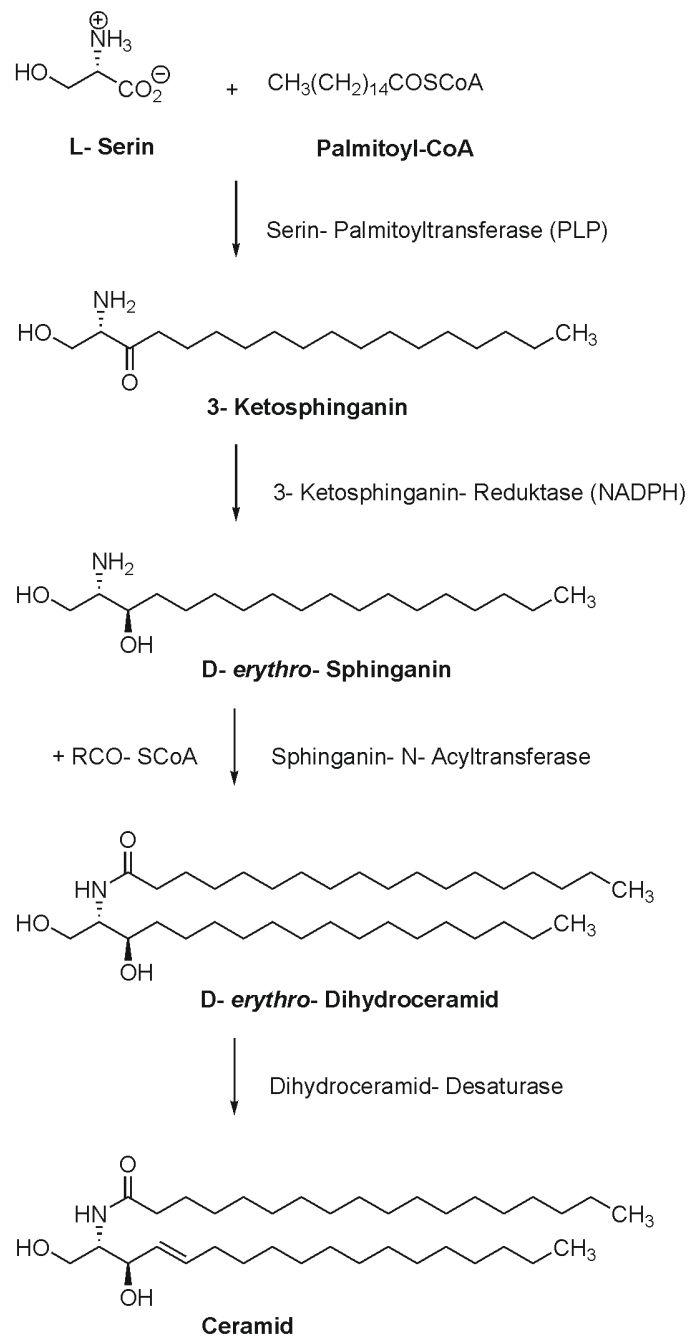


Abbildung 1.1: Biosynthese der Sphingolipide: Für die Bildung des Ceramid ausgehend vom L-Serin sind vier Reaktionsschritte notwendig, alle Reaktionen laufen an der cytosolischen Membranseite des ER ab und werden von membranständigen Enzymen katalysiert.

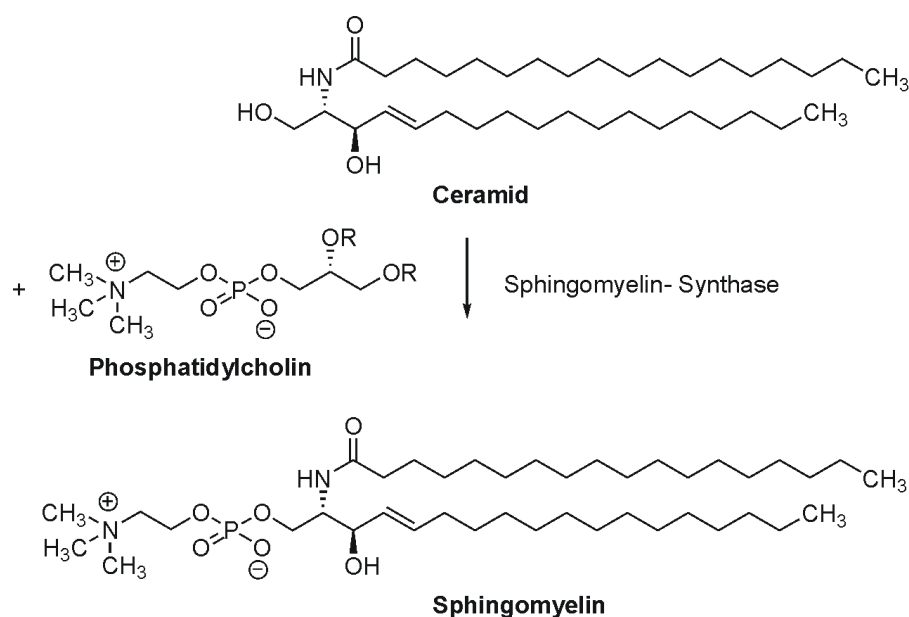


Abbildung 1.2: Biosynthese der Sphingolipide: Bildung von Sphingomyelin aus Ceramid, die Reaktion läuft im Lumen des Golgi-Kompartiments ab.

Für die Bildung des Sphingomyelins kommen auch andere Synthesorte als das Lumen des Golgi-Kompartiments in Frage [22, 23], sie erfordern jedoch einen zusätzlichen Membran-Translokationsschritt auf der Stufe des Ceramids.

Regulation der Sphingolipid-Biosynthese

Zu den Regulationsmechanismen des Glycosphingolipid-Stoffwechsels und -Transports liegen bisher nur wenige Anhaltspunkte vor, es sind jedoch Beispiele für Autoregulation [24] und Regulation auf Transkriptionsebene bekannt [5].

Inhibitoren der Sphingolipid-Biosynthese

Inhibitoren der Sphingolipid-Biosynthese sind als theoretische Möglichkeit zur Behandlung von Sphingolipidspeicherkrankheiten in Betracht zu ziehen. Zusätzlich können sie nützliche Erkenntnisse zur Funktion einzelner Sphingolipide in entsprechenden Ausschaltexperimenten liefern. Es sind zahlreiche Inhibitoren für die Biosynthese von Sphingolipiden bekannt, z.B. das Myriocin [25], welches als Inhibitor

der Serin-Palmitoyltransferase wirkt und pharmakologisch als Immunsuppressivum Anwendung findet.

1.1.2 Katabolismus der Sphingolipide

Der konstitutive Abbau der Sphingolipide vollzieht sich in den sauren Zellkompartimenten, den späten Endosomen und insbesondere den Lysosomen [26, 27]. Dafür ist zunächst der Transport von Sphingomyelin und der Glycosphingolipide von der Zelloberfläche hin zu den Lysosomen erforderlich. Der Prozess beginnt mit der Abschnürung einzelner Bereiche der Plasmamembran in Form von Stachelsaumgrübchen (coated pits) zu intrazellulären Vesikeln. Diese Vesikel gehen Fusionsreaktionen mit späten Endosomen und frühen Lysosomen ein [28]. Die ehemaligen Bereiche der Plasmamembran werden somit in endosomale Membranen integriert, wobei die Glycosphingolipide nun auf der Außenseite der intraendosomalenen bzw. intralysosomalenen Vesikel lokalisiert sind [29]. Der Abbau der Glycosphingolipide beginnt daher an der Oberfläche dieser Vesikel, die eine Art Phasengrenzfläche darstellt, durch sequentielle Entfernung der einzelnen Zuckerreste vom nichtreduzierenden Ende her. Die Reaktion wird durch spezifische Exohydrolasen katalysiert. Für die Spaltung von Glycosphingolipiden mit kurzen Oligosaccharidketten benötigen diese Exohydrolasen häufig ein Aktivatorprotein (z.B. GM2-Aktivator, Saposine SAP-A bis -D), welches als sogenannte Liftase fungiert und das Glycosphingolipid der enzymatischen Spaltung zugänglich macht [30]. Ebenso ist die Anwesenheit des anionischen Phospholipids Bis(monoacylglycero)phosphat (BMP) essentiell für den Abbau der (Glyco-)Sphingolipide. Über niedrig glycosylierte Sphingolipide entsteht dann Ceramid, welches schließlich in Sphingosin und eine langkettige Fettsäure gespalten wird. Die Abbildung Abb. 1.3 zeigt das beschriebene Modell der Endocytose sowie den lysosomalen Membran-Katabolismus.

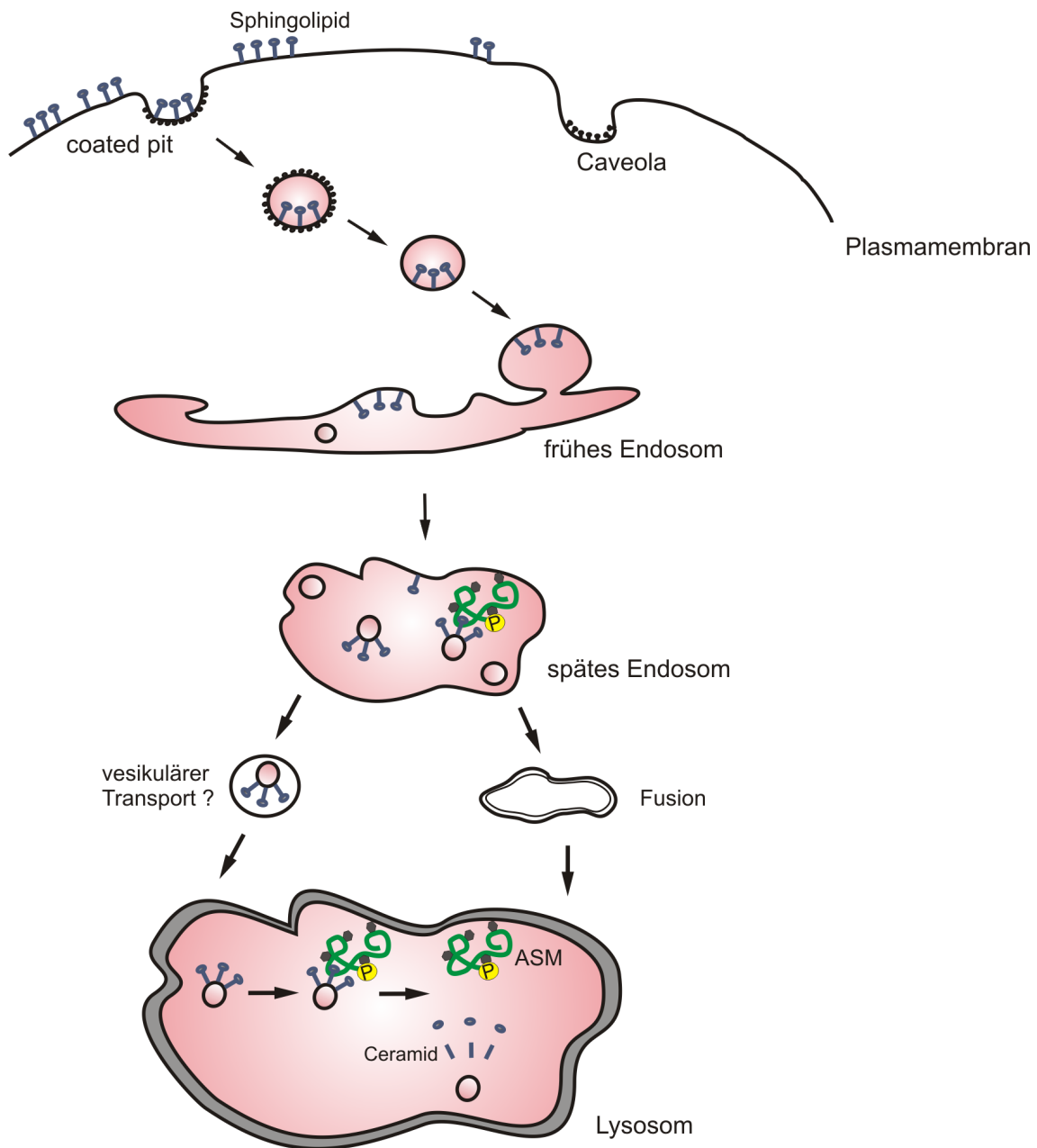


Abbildung 1.3: Modell der Endocytose und des Katabolismus der Sphingolipide im Lysosom (modifiziert nach [31]): Der Abbauprozess wird durch Abschnürung von coated pits eingeleitet, danach erfolgt die Verschmelzung dieser mit den frühen Endosomen. Die Ausbildung intraendosomaler Vesikel führt zu nach außen gerichteter Orientierung der Sphingolipide. Durch Fusionsreaktion der Vesikel mit späten Endosomen und Lysosomen werden diese internalisiert. Nun können die Sphingolipide im Lysosom gespalten werden, z.B. Sphingomyelin durch die saure Sphingomyelinase (ASM) in Phosphorylcholin und Ceramid.

Im Lysosom erfolgt auch der katalytische Abbau kohlenhydratfreier Sphingolipide, z.B. Sphingomyelin. Sphingomyelin wird im ersten Schritt von der sauren Sphingomyelinase in Ceramid und Phosphorylcholin gespalten [32]. Ceramid kann durch die saure Ceramidase zu Sphingosin und der entsprechenden langkettigen Fettsäure abgebaut werden [33], es besteht auch die Möglichkeit der Phosphorylierung zu Ceramid-1-phosphat [34]. Die freigesetzten Bausteine (Monosaccharide, Fettsäuren und Sphingoidbasen) können das Lysosom durch Diffusion oder mittels Transportproteinen verlassen und in andere Stoffwechselwege einfließen.

Neben dem konstitutiven lysosomalen Sphingolipid-Abbau existiert ein nicht-lysosomaler Weg, der streng reguliert abläuft und wichtige Signalmoleküle liefert [35]. In diesem Reaktionszyklus spielen die neutrale und die alkalische Sphingomyelinase sowie die korrespondierenden Ceramidasen eine zentrale Rolle. Durch eine Reihe enzymatischer Spaltungsreaktionen entsteht Sphingosin, welches von der cytosolischen Sphingosinkinase zu Sphingosin-1-phosphat umgewandelt werden kann [36, 37]. Anschließend erfolgt die Pyridoxalphosphat-abhängige Spaltung, die von der Sphingosin-1-phosphat-Lyase an der cytosolischen Seite der ER-Membran katalysiert wird [38]. Der Abbauprozess liefert Ethanolaminphosphat und *trans*-Hexadec-2-enal als finale Kataboliten. Die Abbildung Abb. 1.4 gibt den nichtlysosomalen Katabolismus schematisch wieder.

Sphingolipidosen

Aufgrund des streng sequentiellen Abbaus der Glycosphingolipide tritt, verglichen mit anderen Stoffwechselwegen, hier eine Vielzahl erblich bedingter Krankheiten auf. Dabei rufen nicht nur Defekte der am Glycosphingolipid-Katabolismus beteiligten Enzyme sondern auch Defekte von Aktivator- und Transportproteinen lysosomale Speicherkrankheiten hervor [30, 39–41]. Störungen des Sphingolipidstoffwechsels ziehen die Akkumulation schwerlöslicher Aggregate aus Lipidsubstraten im Lysosom nach sich. Aufgrund des Fehlens alternativer Stoffwechselwege ist für fast jeden Abbauschritt des Glycosphingolipid-Katabolismus eine erblich bedingte Sphingolipidose bekannt. Mit Ausnahme der Fabry-Krankheit werden alle Sphingolipidosen autosomal rezessiv vererbt. Die Tabelle Tab. 1.1 fasst die wichtigsten Sphingolipidosen in einem Überblick zusammen [42].

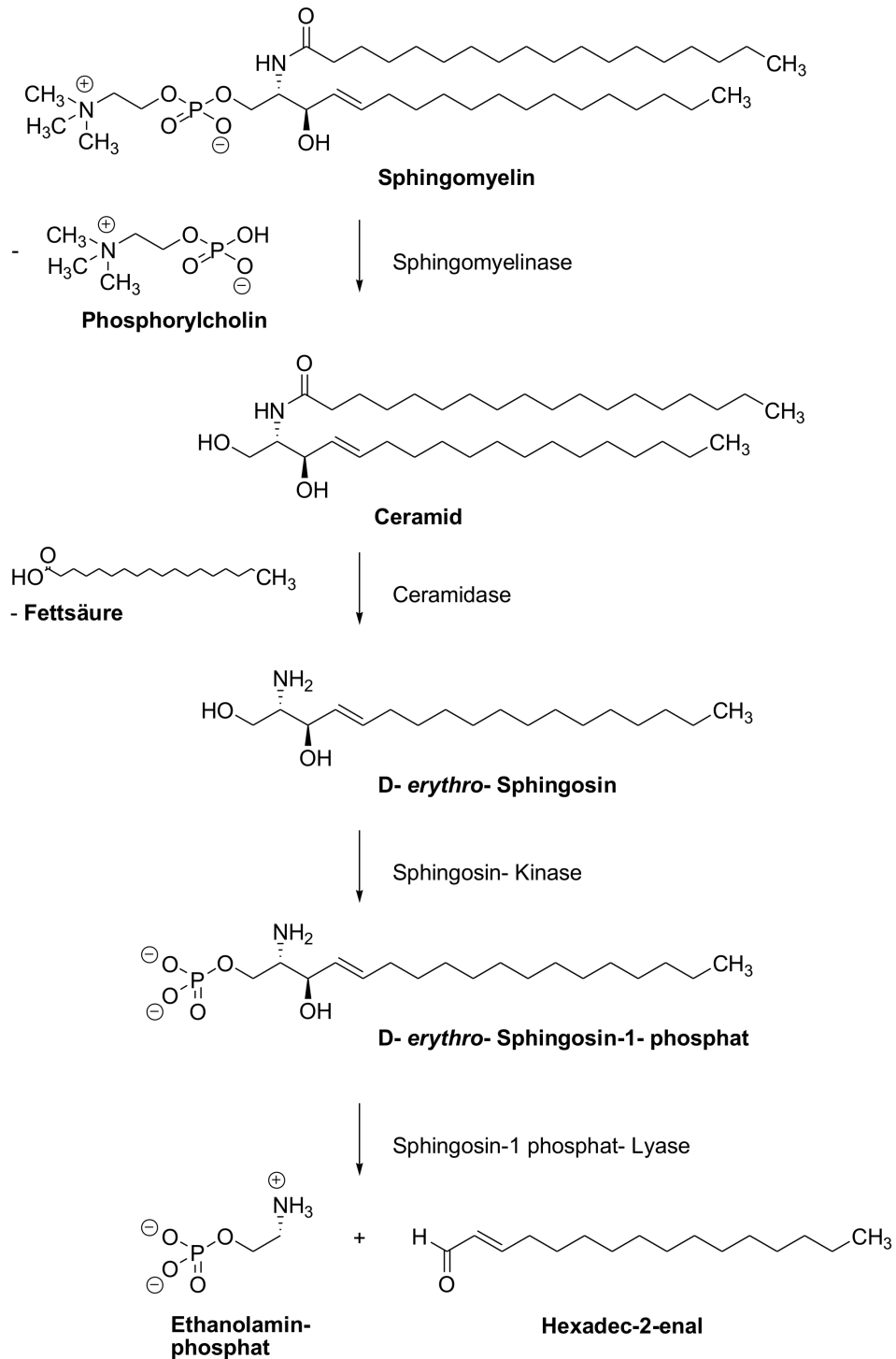


Abbildung 1.4: Nicht-lysosomaler Katabolismus der Sphingolipide.

Tabelle 1.1: Wichtige Sphingolipidosen im Überblick.

Erkrankung	betroffenes Enzym	Speicher-Substanz
GM1-Gangliosidose	β -Galactosidase	Gangliosid-GM1 (neuronale)
GM2-Gangliosidose	β -Hexosaminidase	u.a. Gangliosid GM2
Galactosialidose	β -Galactosidase und Sialidase	Sialinsäure- und Galactosehaltiger Substrate, GM1, GM3
Fabry-Krankheit	α -Galactosidase A	Enzymsubstraten mit α -glycosidisch gebundener terminaler Galactose
Niemann-Pick Typ A, B	saure Sphingomyelinase	Sphingomyelin
Niemann-Pick Typ C	NPC1-Protein, NPC2-Protein	Cholesterol, Sphingomyelin
Gaucher-Krankheit	β -Glucocerebrosidase	Glucosylceramid
Krabbe-Krankheit	lysosomale Galactocerebrosidase	Galactosylceramid
Farber-Krankheit	saure Ceramidase	Ceramid

Inhibitoren des Sphingolipid-Abbaus

Die Auswirkungen eines inhibierten Enzyms des Sphingolipidabbaus sind in Form von Sphingolipidosen beobachtbar. Um Einblicke in die genaue physiologische Funktion der jeweiligen Substrate zu erhalten, sind Inhibitoren für Enzyme des Sphingolipid-Katabolismus ein nützliches Hilfsmittel. Weiterhin können sie für mechanistische Studien am Enzym, beispielsweise der Analyse des aktiven Zentrums, genutzt werden. Gegenwärtig sind Inhibitoren von Sphingomyelinasen, Ceramidasen, der Sphingosinkinase sowie der Sphingosin-1-phosphat-Lyase verfügbar.

Modell der enzymatischen Restaktivität

Die Theorie der enzymatischen Restaktivität [43] bezieht sich auf Krankheiten, bei denen ein Enzymdefekt vorliegt, der nicht zu einem vollständigen Ausfall des betroffenen Enzyms führt, aber auf Grund fehlender alternativer Stoffwechselprozesse eine Erkrankung hervorruft. Dies ist zum Beispiel bei den Sphingolipidosen der Fall. Ursache des Defekts sind hier verschiedene Mutationen und pathobiochemische Mechanismen, welche die Absenkung der katalytischen Aktivität des abbauenden Enzymsystems auf ein gewisses Restniveau innerhalb des lysosomalen Kompartiments bewirken. Die Höhe der verbleibenden katalytischen Aktivität beeinflusst die Pathogenese direkt, da die maximale katalytische Aktivität V_{\max} des mutierten Enzyms im jeweiligen Abbausystem den entscheidenden Zusammenhang von

Genotyp und Phänotyp einer Krankheit darstellt.

Im zellulären Fließgleichgewicht ist die Substratkonzentration von lediglich zwei Faktoren abhängig: der Einstromgeschwindigkeit des Substrats und den kinetischen Parametern des abbauenden Enzyms (K_M und V_{max}). Eine verringerte Enzymaktivität bedingt eine erhöhte Substratkonzentration beziehungsweise größere Substratsättigung des Enzyms und kann von diesem bis zum Erreichen eines kritischen Schwellenwertes (V_{max} des mutierten Enzyms sinkt unter den Wert des Substrat-Einstroms in das Lysosom) kompensiert werden. Erst wenn die katalytische Restaktivität des mutierten Enzyms den kritischen Schwellenwert unterschreitet, kommt es zu einer irreversiblen Akkumulation des entsprechenden Substrats mit den zugehörigen klinischen Symptomen. Je nach Restenzymaktivität kann es somit zur Ausprägung von milden, schwereren und sehr schweren Verlaufsformen einer Krankheit kommen. Dies trifft z.B. auf die Niemann-Pick-Erkrankung zu, bei der die Restenzymaktivität der sauren Sphingomyelinase zwischen unter 2% (Typ A) und etwa 10% (Typ B) variiert. Jedoch kann im Laufe der Zeit bedingt durch die fortschreitende Akkumulation des Substrats Sphingomyelin die milde Verlaufsform in eine schwere Verlaufsform übergehen.

1.1.3 Sphingolipide in der Signaltransduktion

Allgemeine Signaltransduktion

Die Komplexität des Sphingolipid-Metabolismus gewährleistet eine genaue Steuerung der Konzentration vieler verschiedener Moleküle in Zellen, jedes einzelne Zielmolekül übt dabei exakt definierte biologische Funktionen aus. Die Zelle kann somit über Änderungen in ihrem Sphingolipid-Metabolismus auf einen bestimmten Reiz der Situation angepasst reagieren. Mit der Entdeckung des Phosphoinosit-Zyklus 1970 wurde zum ersten Mal der Beweis erbracht, dass Lipide bei der Signaltransduktion eine wichtige Rolle spielen. In aktuellen Studien wurden spezielle Mikrodomänen von Membranen, die besonders reich an Cholesterol und Sphingomyelin sind, die sogenannten lipid rafts, als Zentren für die Organisation von Signalmolekülen identifiziert. Diese Domänen sind wichtig für zelluläre Immunantworten [44] und sind möglicherweise in G-Protein-gekoppelten Rezeptoren [45] sowie Rezeptoren von Wachstumsfaktoren [46] bedeutsam. Das Aufbrechen der lipid rafts durch Cholesterolabbau inhibiert Signaltransduktionsprozesse der T-Zell-Rezeptoren [47]. Die Hydrolyse von Sphingomyelin und Bildung von Ceramid in lipid rafts ist hingegen umstritten.

Der asymmetrischen Verteilung der Phospholipide innerhalb der Plasmamembran scheint ein komplexer Mechanismus zu Grunde zu liegen. Zellen haben ihn möglicherweise entwi-

ckelt, um über die Zugänglichkeit der Substrate für die Phospholipasen eine Steuerung in Signaltransduktionsprozessen ausüben zu können [48].

Rolle und Funktion der Sphingomyelinasen

Im Sphingolipid-Stoffwechsel könnte die Aktivierung von Sphingomyelinasen der Startpunkt einer enzymatischen Kaskade sein, die zu bioaktiven Lipiden und somit Signalmolekülen führt. Eine Vielzahl von Studien legt nahe, dass wahrscheinlich mehr als eine Sphingomyelinase für Signaltransduktionsprozesse von Bedeutung ist. Widersprüchliche Ergebnisse aus diversen Studien, durchgeführt unter anderem mit Niemann-Pick-Patientenzellen und knock-out-Mäusen, lassen zum gegenwärtigen Zeitpunkt keine eindeutige Aussage darüber zu, welche exakte Rolle Sphingomyelinasen im signaltransduktiven Sphingomyelinabbau spielen, und ob die beobachteten Effekte auf die neutrale oder die saure Sphingomyelinase zurückzuführen sind. Insbesondere die lysosomale Form der sauren Sphingomyelinase scheint auf Grund ihrer Lokalisation für eine Rolle in der Signaltransduktion nicht prädestiniert zu sein, denn es ist bisher nicht nachvollziehbar, wie ein Signal, welches von einem stimulierten Rezeptor (z.B. TNF, Fas) in das Cytoplasma ausgesendet wird, eine Aktivierung eines lysosomalen Enzyms bewirken soll. Zudem müsste das gebildete Ceramid für die Fortsetzung der Signaltransduktion seinen Entstehungsort, das Lysosom, verlassen um mit seinen Zielobjekten in Wechselwirkung zu treten, was nachweislich nicht der Fall ist [49]. Demzufolge müssten dann die Metaboliten des Ceramid (z.B. Sphingosin) das Lysosom verlassen und auf direktem Weg oder über metabolische Zwischenstufen die intrazellulären Zielmoleküle aktivieren. Anderenfalls wäre die lysosomale saure Sphingomyelinase für die Bildung von signaltransduktiv-relevantem Ceramid ohne Bedeutung. Vermutlich spielen die sekretorische Form der sauren Sphingomyelinase sowie die neutrale Sphingomyelinase eine wesentlich größere Rolle in Signaltransduktionsprozessen.

Wie aktuelle Studien zeigen, können Sphingomyelinasen durch das Cytokin CD 95 stimuliert werden. So wurde beispielsweise eine Translokation der sauren Sphingomyelinase zur äußeren Schicht der Plasmamembran beobachtet [50]. Die Generation von Ceramid an der Zelloberfläche löste eine Cluster-Bildung von Rezeptoren aus und führte letztlich zur Apoptose.

In einer zweiten Studie hingegen induzierte das Cytokin CD 95 eine Umverteilung von Sphingomyelin von der äußeren Schicht der Plasmamembran zur inneren Schicht. Diese Neuverteilung machte Sphingomyelin dem Abbau durch die cytosolische neutrale Sphingomyelinase zugänglich, die Entstehung von Ceramid im Cytosol ging dabei mit apoptotischer Bläschenbildung in der Membran einher [51].

Die Regulation der Sphingomyelinasen in der Signaltransduktion erfolgt unter anderem durch mehrfach ungesättigte Fettsäuren (z.B. Arachidonsäure) von denen eine Aktivierung der neutralen, nicht jedoch der sauren Sphingomyelinase, ausgeht [52].

Rolle und Funktion des Ceramids

Als Antwort auf Stressfaktoren beobachtet man in Säugetierzellen häufig eine vorübergehende oder anhaltende Erhöhung des Ceramidspiegels [53]. Dies ist meist auf die Aktivierung von Sphingomyelinasen oder die *de novo*-Biosynthese durch die Ceramid-Synthase zurück zu führen. Inzwischen mehren sich die Hinweise, dass nicht nur an der Plasmamembran gebildetes Ceramid sondern auch Spezies, die im ER, den Mitochondrien oder den Endosomen entweder durch anabole oder durch katabole Prozesse entstanden sind, an Signaltransduktionsprozessen beteiligt sein könnten.

Die Substanzklasse der Ceramide gehört zu den relativ kleinen, hydrophoben, neutralen Lipiden; am häufigsten sind Ceramide mit 16 oder mehr Kohlenstoffatomen. Auf Grund dieser Eigenschaften verbleibt Ceramid in der Lipiddoppelschicht, in der es entstanden ist [54], und die Interaktion mit dem Zielmolekül muss innerhalb dieser Doppelschicht erfolgen. Im Wesentlichen scheint es zwei Formen der Interaktion von Ceramid mit seinen Zielobjekten zu geben. Entweder induziert Ceramid Veränderungen des Bindungsverhaltens eines Proteins an die Membran, oder es bindet spezifisch an eine bestimmte Region des Zielproteins und beeinflusst so die Enzymaktivität [55].

Die Bildung von Ceramid steht im Zusammenhang mit stressinduzierten Antworten der Zellen. Dabei ist das Ergebnis der Ceramid-vermittelten Signaltransduktion abhängig vom jeweiligen Zelltyp, im Allgemeinen kommen dabei antimitogene Effekte zum Tragen. Einige Zellen nutzen Ceramid für die Einleitung der Differenzierung, während es in anderen Zellen der Proliferation oder dem Wachstumsstopp dient. Das am häufigsten auftretende Resultat ist jedoch die Einleitung der Apoptose [56–59]. Zudem gibt es Hinweise auf eine Regulation der Produktion entzündungsauslösender Eicosanoide durch Ceramid oder seine Metaboliten [60, 61].

In einigen Fällen konnten die direkten Zielmoleküle des Ceramids bereits identifiziert werden. Dazu zählen z.B. die Ceramid-aktivierbaren Proteinphosphatasen (CAPP) [62], zu denen unter anderem die Serin/ Threonin-Proteinphosphatasen PP1 und PP2A gehören. Die Aktivierung der CAPP durch Ceramid erfolgt stereospezifisch und erfordert daher das unbedingte Vorhandensein der 4-5-trans-Doppelbindung in der Sphingoidbase [63]. Ein weiteres Zielmolekül der Ceramide ist die Ceramid-aktivierbare Proteinkinase (CAPK)

[64], dessen Aktivierung die Wirkung des Ceramids auf die ERK Map-Kinasen vermittelt [64, 65]. Ebenso ist Ceramid in der Lage Cathepsin D, eine Ceramid-bindende Protease, spezifisch zu aktivieren [66, 67].

Dennoch sind die genauen biochemischen Mechanismen zur Entstehung und Rolle des Ceramids in der Signaltransduktion bisher unbekannt. Viele Beispiele beschreiben die Entstehung von Ceramid aus Membrandomänen, die reich an Sphingomyelin, komplexen Sphingolipiden und Cholesterol sind. Welche Sphingomyelinase die Hydrolyse des Sphingomyelins aus dieser Quelle bewerkstelligt, ist umstrittener. Als Resultat jedoch liegt Ceramid in einem kleinen Membranbereich zusammen mit Rezeptoren, Effektoren und dem Sphingomyelin/ Ceramid-Umwandlungsimpuls vor. Infolgedessen können primär Ceramid-vermittelte Effekte nur innerhalb kurzer Distanzen auftreten, z.B. Ioneneinstrom auf Grund von erhöhter Membranpermeabilität oder Änderungen von Enzymaktivität resultierend aus Membranamverteilungen oder Lipiddoppelschicht-Verschiebungen. Es kann auch zu Ceramid-induzierten Protein-Protein-Wechselwirkungen kommen, so wurde beispielsweise die Bildung von dimeren und oligomeren Proteinkomplexen nach Anbindung von Ceramid beobachtet. In Anbetracht der Tatsache, dass Ceramid das Zellkompartiment (z.B. Lysosom), in dem es gebildet wurde, nicht verlassen kann, bleiben viele Aspekte der Ceramid-vermittelten Signaltransduktion bisher rätselhaft, insbesondere die zeitliche Regulation der Antwortprozesse sowie die Reaktionsmechanismen mit den Zielmolekülen. Dennoch handelt es sich bei der Vorstellung, dass an der Plasmamembran gebildetes Ceramid dort einen Einfluss auf die Membrankrümmung oder die Bildung von lipid rafts ausübt um ein plausibles Modell. Konzeptionell ist die Aufhebung des Signals durch Abtransport des gebildeten Ceramids mittels Endocytose denkbar.

Rolle und Funktion des Sphingosins

Allem Anschein nach entsteht Sphingosin allein durch katalytische Aktivität von Ceramidasen, da bisher kein Hinweis auf eine *de novo*-Synthese gefunden wurde.

Sphingosin übt inhibitorische Wirkung auf die Proteinkinase C (PKC) [68] und auf die Phosphatidsäure-Phosphohydrolase aus [69], im Gegensatz dazu vermittelt es aktivierende Effekte auf die Phospholipase D und die DAG-Kinase [70, 71]. Somit ist Sphingosin in der Lage, durch Erhöhung des Spiegels an Phosphatidsäure eine Ausschaltung des DAG/ PKC-Signalweges herbeizuführen. Daneben sind viele weitere Zielmoleküle des Sphingosins bekannt. Die Aktivität bzw. Reaktion des Sphingosins scheint Zelltyp-spezifisch zu sein, da in einigen Zellen antimitogene Effekte zum Tragen kommen, in anderen Zellen hingegen promotogene Wirkung auftritt [56].

Rolle und Funktion des Sphingosin-1-phosphats

Sphingosin-1-phosphat ist eine der häufigsten in Säugerzellen vorkommenden phosphorylierten Sphingoidbasen. Die Interaktion von Sphingosin-1-phosphat (S1P) mit G-Proteingekoppelten Rezeptoren führt zu einer ganzen Reihe von Antwortprozessen [72–74], unter anderem Proliferation [72], Stimulation des Zusammenfügens von Actin-Fibrillenbündeln [75] und Inhibition von Ceramid-induzierter Apoptose [76–78]. S1P kann sich schnell zwischen Membranen hin und her bewegen, daher kann es sowohl intrazelluläre Wirkung entfalten, als auch extrazelluläre Effekte herbeiführen, beispielsweise die Mobilisierung von Ca^{2+} aus intrazellulären Quellen oder die Inhibition von Caspasen [78–81].

1.2 Enzyme des lysosomalen Stoffwechsels

1.2.1 Biosynthese und Transport lysosomaler Enzyme

Lysosomale Enzyme werden zusammen mit sekretorischen und Plasmamembran-Proteinen an den membrangebundenen Polysomen im rauen endoplasmatischen Reticulum (ER) synthetisiert. Jedes dieser Proteine enthält ein hydrophobes N-terminal-ständiges Signalpeptid, welches mit dem Signalerkennungspartikel zusammenwirkt und so den vektoralen Transport des naszierenden Proteins durch die Membran des ER hindurch in das Lumen dieser Zellorganelle hinein induziert [82–84]. Dort findet die cotranslationale Glykosylierung der lysosomalen Enzyme (wie auch der meisten sekretorischen und Plasmamembran-ständigen Proteine) an bestimmten Asparaginresten statt. Der Glykosylierungsschritt erfolgt in Form eines Blocktransfers großer, bereits vorgebildeter Oligosaccharide von einem Lipid-gebundenen Intermediat auf das naszierende Polypeptid [85]. Lysosomale Enzyme unterliegen zudem weiterer proteolytischer Prozessierung. Sie werden als Preproformen mit amino-terminaler Verlängerung (Signalpeptid) synthetisiert [86]. Nach Abspaltung des Signalpeptids und einigen weiteren Prozessierungsschritten an den Oligosaccharid-Seitenketten verlassen die Proteine das ER und gelangen über Vesikeltransport in den Golgi-Apparat, wo zahlreiche posttranslationale Modifikationen vorgenommen werden. Danach erfolgt eine Sortierung entsprechend des Bestimmungsorts (Lysosom, sekretorische Granule oder Plasmamembran). Während des Aufenthaltes im Golgi-Apparat werden die Oligosaccharide der sekretorischen und der membrangebundenen Proteine zu Sialinsäurehaltigen, komplexen Einheiten prozessiert, die meisten der lysosomalen Enzyme hingegen durchlaufen andere Modifikationsprozesse. Der wichtigste Schritt hierbei ist die Anbindung von Phosphomannosylresten, da diese als Erkennungsmerkmal für den Mannose-6-phosphat-

Rezeptor dienen, der für die spätere Translokation zum Lysosom verantwortlich ist [87]. Der gebildete Ligand-Rezeptor-Komplex verlässt den Golgi-Apparat in Form von beschichteten Vesikeln und gelangt in ein prelysosomales Kompartiment. Als Folge der sauren Umgebung, die in diesem Kompartiment herrscht, dissoziiert der Ligand vom Komplex ab [88] und der frei gewordene Rezeptor begibt sich zurück zum Golgi-Apparat. Eine kleine Menge der lysosomalen Enzyme (5 – 20 %) wird sekretiert, bevor die Abgabe in die primären Lysosomen erfolgt. Ein Teil dieser Enzyme bindet vermutlich an Mannose-6-phosphat-Rezeptoren, die sich an der Zelloberfläche befinden, wird anschließend internalisiert und an die Lysosomen abgegeben [89]. Erst nach der Ankunft im Lysosom ist die proteolytische Prozessierung abgeschlossen, und das lysosomale Enzyme erlangt volle katalytische Aktivität [90].

1.2.2 Die saure Sphingomyelinase

Als Roitman und Gatt 1963 [91] die Isolierung einer Sphingomyelin-hydrolysierenden Phospholipase C aus Rattenhirn gelang, schlug die Geburtsstunde der Erforschung der Sphingomyelinasen. In den nachfolgenden Jahren wurden Sphingomyelinasen aus verschiedenen Geweben, wie z.B. humanem Gehirn [92–94], Plazenta [95–98] oder Rattenleber [99] aufgereinigt und Studien hinsichtlich ihrer Charakterisierung durchgeführt. Der Klassifizierung nach Samet und Barenholz folgend [100], unterteilt man die Sphingomyelinhydrolasen entsprechend des optimalen pH-Wertes für die katalytische Aktivität in saure, neutrale und alkaline Sphingomyelinasen. Die Isolation von saurer Sphingomyelinase aus menschlichem Urin lieferte schließlich im Jahr 1987 die zugehörige cDNA dieses Enzyms [101]. Diese Entdeckung ebnete den Weg für die rekombinante Gewinnung des Enzyms, welches heutzutage in verschiedenen Zellkultursystemen, unter anderem Insektenzellen [102] oder CHO-Zellen [103], exprimiert werden kann. Die saure und die neutrale Sphingomyelinase sind die beiden am besten charakterisierten Enzyme der Familie der Sphingomyelinasen. Dennoch bleiben viele Fragen hinsichtlich der Struktur und des Katalysemechanismus dieser Enzyme bisher unbeantwortet.

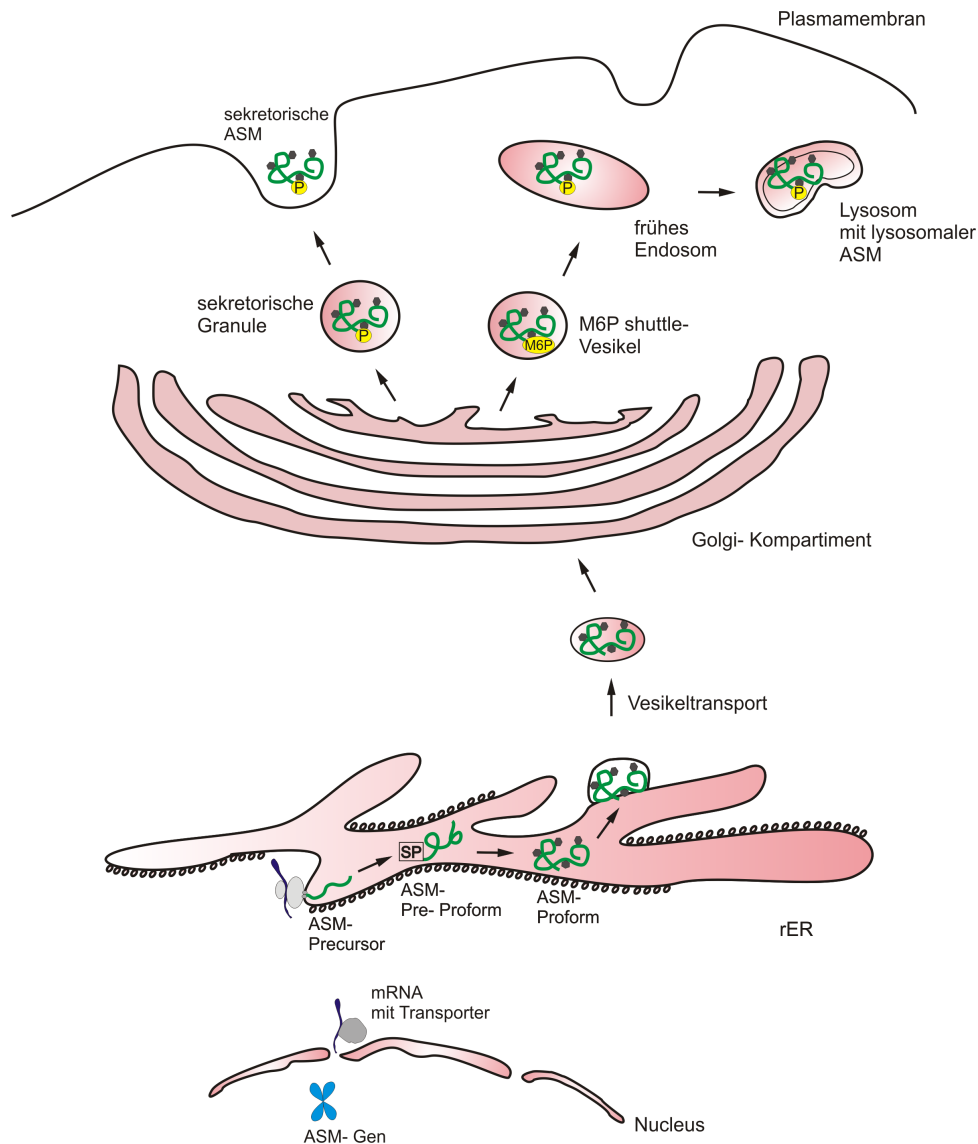


Abbildung 1.5: Biosynthese lysosomaler Enzyme am Beispiel ASM: Die mRNA gelangt Transporter-vermittelt zum rauen ER, dort wird zunächst der ASM-Precursor gebildet. Nach Anfügung der Signalpeptidsequenz geht dieser in die Pre-Proform über. Anschließend erfolgen cotranslationale Glykosylierung und proteolytische Abspaltung des Signalpeptids, die resultierende ASM-Proform gelangt über Vesikeltransport in den Golgi-Apparat, wo weitere posttranslationale Modifikationen (z.B. Phosphorylierung) stattfinden. Bei einer Teilmenge der Proform führen zusätzliche Prozessierungsschritte zur Ausbildung eines komplexen Glykosylierungsmusters, dieser Teil erreicht über den sekretorischen Transportweg die Plasmamembran. Der Rest der Proform wird nach Anbindung der Phosphomannosylresten von M6P-Rezeptoren erkannt, zu den Endosomen/ Lysosomen transportiert und an diese abgegeben. In den Lysosomen unterliegt die ASM-Proform abschließender N-terminaler proteolytischer Prozessierung.

Prozessierung, Struktur und Enzymologie

Das Gen der sauren Sphingomyelinase trägt die Bezeichnung SMPD1. Es ist auf Chromosom 11 (Region p15.1- p15.4) lokalisiert [104], umfasst 5 – 6 kb und enthält 6 Exons (77 – 773 bp) sowie 5 Introns (153 – 1059 bp) [105]. Eine mRNA ergibt drei verschiedene Splice-Varianten, von denen jedoch nur eine, die Hauptkomponente, zu enzymatisch aktivem Protein führt [106]. Die Vollängen cDNA dieses Typ1-Transkripts weist eine Länge von 2347 bp auf und ist durch einen 5'-untranslationierten Bereich von 87 bp gekennzeichnet. Ein offener Leserahmen von 1890 bp codiert ein 629 Aminosäuren umfassendes Polypeptid [106].

Das reife Enzym entsteht aus einer ASM-Precursorform durch partielle Spaltung [107, 108]. Das im ER gebildete primäre Translationsprodukt (Pre-Proform) hat eine Größe von 75 kDa und ist bereits mit Oligosaccharidketten des high-mannose-Typs glykosyliert, es zeigt jedoch keine signifikante Enzymaktivität. Die anschließende Abspaltung des Signalspeptids (44 AS) liefert die 72 kDa große Proform des Enzyms, die ebenfalls ohne signifikante enzymatische Aktivität ist. Aus dieser Proform entstehen auf unterschiedlichen Wegen die beiden reifen Formen der sauren Sphingomyelinase, die sekretorische Form (sASM) und die lysosomale Form (lASM). Die sASM wird über den sekretorischen Golgi-Transportweg transportiert, wobei eine Prozessierung der N-Glykane zum komplexen Glykosylierungsmuster stattfindet. Zudem erfolgt eine N-terminale proteolytische Prozessierung, sodass das reife Enzym mit der Aminosäure His⁶⁰ beginnt und eine Größe von 70 kDa aufweist. Durch Vesikelfluss und -verschmelzung gelangt die sASM zur Plasmamembran und liegt anschließend in sekretierter Form vor. Auf seinem Weg dahin kommt das Enzym offenbar nur in geringem Maße mit zellulären Zinkquellen in Kontakt und ist daher durch exogenes Zn²⁺ in seiner Aktivität stark stimulierbar [109]. Im Gegensatz dazu nimmt die lysosomale Form einen anderen Weg hin zu ihrem Bestimmungsort, dem Lysosom. An einen Teil der Proform werden Phosphomannosylreste gebunden, diese gewährleisten den anschließenden Transport des Enzyms zu den Endosomen/ Lysosomen über das Mannose-6-phosphat-Rezeptorsystem. Hier werden sowohl weitere N-terminale als auch C-terminale Prozessierungsschritte durchlaufen. Das reife Enzym lASM beginnt daher mit der Aminosäure Gly⁸³ und endet mit der Aminosäure Gln⁶²⁰. Es resultiert ein 65 kDa großes Enzym, welches durch exogenes Zn²⁺ in seiner Aktivität nicht weiter stimulierbar ist [109]. Offensichtlich kommt auf dem lysosomalen Transportweg ein ausreichender Kontakt mit zellulären Zinkquellen zustande, sodass von einer Sättigung des Enzyms mit Zn²⁺ auszugehen ist. Neuere Studien weisen die Anwesenheit weiterer Formen der sauren Sphingomyelinase nach. So liegt z.B. im ER eine 57 kDa ASM-Spezies vor, die eine mäßige katalytische Aktivität zeigt und keine

Oligomannosyl-Phosphatreste trägt [110]. Es handelt sich vermutlich um ein Produkt früher proteolytischer Spaltungsreaktionen. Das die Menge an dieser 57 kDa ASM-Form stark variiert deutet auf eine spezifische Kontrolle des Prozesses, z. B. durch regulierte Proteasen, hin. In den sauren Zellkompartimenten konnte kürzlich eine inaktive 52 kDa ASM-Spezies identifiziert werden, die durch eine nicht näher charakterisierte Thiolprotease gebildet wird [111].

Die posttranslationalen Modifikationen der sauren Sphingomyelinase sind für die korrekte Faltung, den Transport und die katalytische Aktivität des Enzyms unerlässlich. Es wurden 6 potentielle N-Glykosylierungsstellen identifiziert, von denen aber im humanen Enzym nur 5 tatsächlich genutzt werden [112]. Lediglich bei rekombinant aus *Sf* 21 Zellen hergestellter humaner ASM liegt eine Glykosylierung aller sechs möglichen Positionen vor. 16 der vorhandenen 17 Cysteinreste des Enzyms sind an der Bildung intramolekularer Disulfidbrücken beteiligt [113], sie werden von Protein-Disulfidisomerasen im oxidierenden Lumen des ER gebildet. Die beschriebene hohe Sensitivität der ASM gegenüber reduzierenden Reagenzien [114], die eine Inaktivierung des Enzyms zur Folge hat, ist wahrscheinlich auf die Reduktion der 8 intramolekularen Disulfidbrücken zurückzuführen. Aus der Oxidation oder Entfernung des unverbrückten, terminalen Cysteins Cys⁶²⁹ resultiert dagegen ein 4- bis 5-facher Anstieg der katalytischen Aktivität [115], sodass man von einem zellulären Mechanismus zur Reifung bzw. Aktivierung des Enzyms ausgehen könnte. Eine weitere posttranslationale Modifikation stellt die Phosphorylierung der Aminosäure Ser⁵⁰⁸ dar. Diese Phosphorylierung scheint für die Aktivierung und Relokalisation der sauren Sphingomyelinase an der Plasmamembran zwingend erforderlich zu sein [116–118].

Zu den Eigenschaften der sauren Sphingomyelinase gehört die Abhängigkeit der Enzymaktivität vom pH-Wert. *In vitro* liegt das pH-Optimum des Enzyms zwischen 4,5 und 5,5, tatsächlich kann insbesondere die sekretorische Form der ASM Sphingomyelin auch bei annähernd neutralem pH-Wert hydrolysieren, sodass enzymatische Aktivität zwischen pH 4,0 und 6,5 nachweisbar ist [119, 120]. Der pI liegt bei etwa 5,0. In Abhängigkeit vom Reinheitsgrad der Enzympräparation ist auch eine breitgefächerte Spanne für die maximale Reaktionsgeschwindigkeit in der Literatur zu finden, die Werte für V_{\max} sind zwischen 13,5 und 1300 mmol* mg⁻¹ h⁻¹ (mit Zn²⁺-Zusatz) bzw. 4,3 und 560 mmol* mg⁻¹ h⁻¹ (ohne Zn²⁺-Zusatz) angesiedelt. Entsprechend variieren auch die Werte für K_M von 2 bis 500 µmol/L.

Neben der Primärstruktur der humanen sauren Sphingomyelinase sind bislang nur das N-Glykosylierungsmuster und die Lage der Disulfidbrücken weitestgehend aufgeklärt. Eine Kristallstruktur ist derzeit nicht verfügbar, es liegen allerdings einige Modellberechnungen zur Struktur vor. Mittels Sequenzhomologie-Abgleich konnte einigen Bereichen des Enzyms

eine Funktion zugeordnet werden (vergleiche Abbildung Abb. 1.6). Demnach befindet sich am Beginn des N-Terminus das Signalpeptid (erste 44 Aminosäuren), auf das eine Domäne unbekannter Funktion folgt. In dieser Region befindet sich der eigentliche Anfangspunkt der reifen sauren Sphingomyelinase (His⁶⁰ bei der sASM und Gly⁸³ bei der lASM). Daran schließt die sogenannte SAP-Domäne an (Aminosäure 89- 165). Diese von Ponting identifizierte Domäne trägt ihren Namen auf Grund ihrer signifikanten Übereinstimmung mit Saposin-typischen Sequenzen [121]. Saposine, oft auch als SAP's (Sphingolipidaktivator-Proteine) bezeichnet, sind nicht-enzymatische Glykoproteine, die vorrangig in sauren Zellkompartimenten vorkommen und den Abbau verschiedener Sphingolipide erleichtern, indem sie diese aus der Membran herausheben und somit dem abbauenden Enzym zugänglich machen [31]. Sie werden in die Saposine A bis D eingeteilt. Dabei ist SAP B ein vergleichsweise unspezifischer Aktivator, der den Sphingomyelinabbau durch Vermittlung von Löslichkeitseffekten auf das Lipid stimuliert [122, 123]. SAP D hingegen wirkt als spezifischer Aktivator des Sphingomyelinabbaus durch ASM [124]. Die in der sauren Sphingomyelinase vorhandene Domäne besitzt einen zu den SAP's B und D homologen Aufbau und wird durch eine Prolin-reiche Domäne (Aminosäure 166- 198) von der katalytischen Domäne des Enzyms getrennt. Diese Art der Anordnung führte zu der Annahme, dass die SAP-Domäne als intramolekulare Aktivatorregion für die Sphingomyelin-Hydrolyse fungiert und die Prolin-reiche Domäne dabei die Rolle einer Gelenkregion übernimmt. Möglicherweise vermittelt die SAP-Domäne die Affinität von ASM zu den Lipidsubstraten oder sie stimuliert die Enzymaktivität durch eine intramolekulare Wechselwirkung mit der C-terminalen Region des Enzyms, die die katalytische Domäne beinhaltet. Die katalytische Domäne umfasst die Aminosäuren 199 bis 629 und stellt das aktive Zentrum des Enzyms dar. Sie wird in zwei Bereiche unterteilt, die Phosphodiesterase-Domäne (Aminosäure 199 bis 461) und die C-terminale Region (Aminosäure 462- 629). Im letztgenannten Bereich tritt eine besondere Häufung von Mutationen auf, die zur Niemann-Pick-Erkrankung, insbesondere des Typs B, führen.

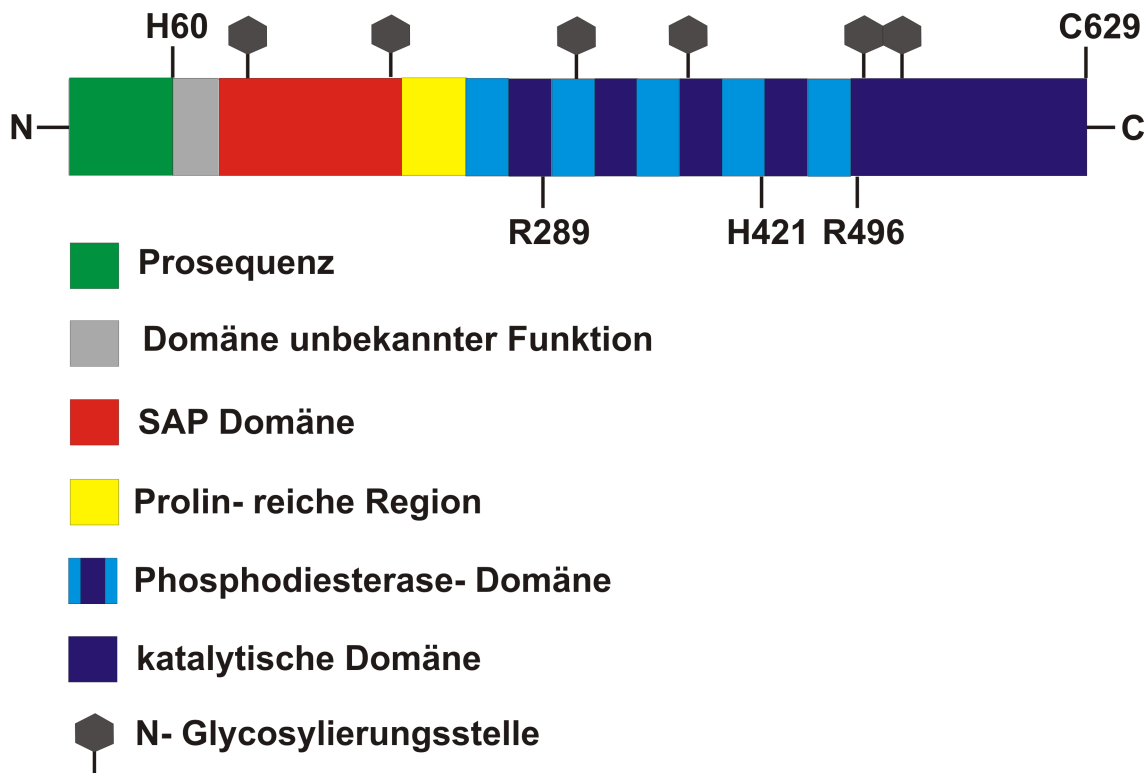


Abbildung 1.6: Domänenstruktur der sauren Sphingomyelinase (Variation nach [121]): AS 1- 46 Prosequenz (mit Signalpeptid), AS 87- 165 SAP- Domäne, AS 166- 198 Prolin-reiche Region, AS 199- 461 Phosphodiesterase-Domäne, AS 199- 629 katalytische Domäne; H60 bezeichnet den N-Terminus und C629 den C-Terminus der sekretorischen ASM. N-Glykosylierungsstellen liegen an Asn 86, 175, 335, 395, 503 und 520 vor, dabei ist Asn 503 nur bei der rekombinanten, im Baculovirusexpressionssystem aus *Sf 21* Zellen erhaltenen ASM glykosyliert, nicht jedoch in nativer humaner ASM. Die Lage dreier Punktmutationen, die zur Niemann-Pick-Krankheit führen, ist wie folgt angegeben: R289H (Typ B), H421Y (schwerer Typ B) und R496L (Typ A). Das Disulfidbrückenmuster wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht eingezeichnet.

Mechanismus der Katalyse, Lipidaktivatoren und Inhibitoren der sauren Sphingomyelinase

Da die exakte Struktur der sauren Sphingomyelinase aktuell nicht bekannt ist, können für den Katalysemechanismus des Enzyms nur Vermutungen angestellt werden. Ein Modell zur Katalyse des Enzyms wurde von M. Seto entwickelt [125] und basiert auf dem Vergleich der strukturellen Homologie (Sequenz und Faltung) mit dem Enzym purple acid Phosphatase

(PAP) von Säugetieren. Auf Grund der relativ geringen Sequenz-Übereinstimmung von ASM und PAP (ca. 15%) ist die Aussagekraft dieses Modells begrenzt, die beste Übereinstimmung wurde demnach für die Metallion-Bindungsmotive des Proteins erzielt. Dennoch lassen sich erste Einblicke in die mögliche Fixierung des Substrats und den Mechanismus im Ganzen gewinnen.

Demnach soll im ersten Schritt eine am Zn^{2+} -Zentrum koordinierte Hydroxidgruppe nucleophil am Phosphoratom des in der Enzymbindungsstasche fixierten Substrats Sphingomyelin angreifen. Das Phosphoratom der Phosphoestergruppe befindet sich nun im 5-fach koordinierten Übergangszustand. Ein Histidinrest des Enzyms doniert anschließend ein Proton an eines der Sauerstoffatome, über welche das Phosphoratom verbrückt ist, und erleichtert so die Spaltung der Phosphor-Sauerstoffbindung. Während der Hydrolyse findet am Phosphoratom eine Inversion der Konformation statt, sodass man von einer $\text{S}_{\text{N}}2$ -Hydrolysereaktion sprechen kann. Die Abbildung Abb. 1.7 gibt den Sachverhalt schematisch wieder.

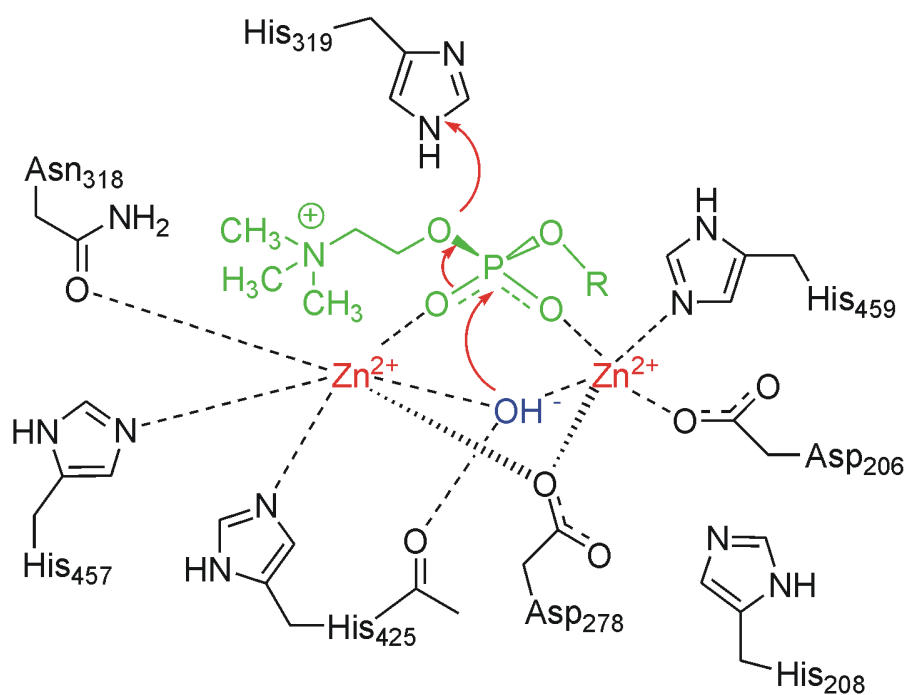


Abbildung 1.7: Modell der Phosphodiesterase-Domäne der ASM: vorgeschlagener Katalysemechanismus nach Seto [125]; die Übereinstimmung beträgt etwa 15%.

Der Abbau von Sphingomyelin durch die saure Sphingomyelinase kann durch die Lipidkomposition in der Substratmembran beeinflusst werden. So wirken z.B. die Lipide Bis(monoacylglycero)phosphat (BMP) und Phosphatidylinositol (PI) als Aktivatoren der Hydrolyse [126], während verschiedene phosphorylierte Derivate des PI eine inhibitorische Wirkung *in vitro* zeigen [127, 128]. Möglicherweise handelt es sich hierbei um einen Regulationsmechanismus von Aktivierung und Deaktivierung der ASM in Zellen. Als bislang potentester phosphathaltiger Inhibitor der sauren Sphingomyelinase wurde die Substanz α -Aminodecyl-1,1-bisphosphonat identifiziert [129], die zudem eine hohe Selektivität aufweist. Man vermutet, dass die inhibitorische Wirkung dieser Substanz auf einer Komplexbildung des Zn^{2+} im aktiven Zentrum des Enzyms beruht. Weitere Inhibitoren stellen unter anderem die trizyklischen Antidepressiva wie Imipramin, Desipramin und Amitriptylin dar. Diese seit langem bekannten funktionellen Inhibitoren sind ein häufig genutztes Mittel zur Erforschung der sauren Sphingomyelinase in Zellkulturstudien [130]. Die Inhibitoren gelangen teilweise durch Diffusion zum anderen Teil über Endocytose in die Lysosomen. Das dort herrschende saure Milieu führt zur Protonierung dieser basischen Substanzen, sodass diese das Zellkompartiment nicht mehr verlassen können. Nach entsprechender Anreicherung in den Lysosomen tritt vermutlich eine Wechselwirkung der protonierten Inhibitoren mit den anionischen Lipiden der inneren lysosomalen Membran (z.B. BMP) auf, die sich störend auf die Bindung der sauren Sphingomyelinase an die Membran auswirken dürfte. Folglich verliert das Enzym nach und nach seinen Bindungspartner und wird somit einem raschen proteolytischen Abbau zugeführt [131]. Nach demselben Prinzip werden aber auch andere Enzyme des Sphingolipid-Metabolismus, wie z.B. die saure Ceramidase, durch diese Substanzen inhibiert [132]. Der vermutete Reaktionsmechanismus liefert ebenfalls die Erklärung dafür, warum diese Art von Inhibitoren keine Wirkung in mizellaren und *in vitro*-Assays, sowie auf die sekretorische Form der ASM allgemein entfalten können.

Niemann-Pick-Krankheit

Die bereits erwähnte Niemann-Pick-Erkrankung gehört zu den lysosomalen Speicherkrankheiten und resultiert aus der stark reduzierten Aktivität des Enzyms humane saure Sphingomyelinase und der daraus folgenden Sphingomyelin-Akkumulation [133]. Die Krankheit wird autosomal rezessiv vererbt. Ursache der stark verminderten Enzymaktivität sind verschiedene allelische Mutationen im Gen der ASM, daher sind immer sowohl die sekretorische als auch die lysosomale Form der ASM betroffen. In bestimmten Bereichen der ASM scheint eine gewisse Anhäufung von Mutationen vorzuliegen, so enthält z.B. der C-Terminus rund ein Drittel aller bekannten Niemann-Pick Mutationen, insgesamt 85 Mutationen wur-

den bis heute gefunden. Man unterscheidet mehrere Subtypen der Erkrankung, wobei eine Korrelation des Schweregrads der Krankheit mit der Restenzymaktivität der ASM besteht. Im Jahr 1914 wurde erstmals ein Patient mit dieser Erkrankung von Albert Niemann beschrieben [134], das Kind jüdischer Abstammung verstarb im Alter von nur 18 Monaten. 1927 erkannte Ludwig Pick weitere Details und Unterschiede zu anderen Lipidosen [135]. Durch Klenk wurde im Jahr 1934 das gespeicherte Phospholipid als Sphingomyelin identifiziert [136], bevor 1966 die Fehlfunktion der sauren Sphingomyelinase als Ursache des Niemann-Pick Syndroms erkannt wurde [137, 138]. Je nachdem, welche Mutation im ASM-Gen vorliegt, erkrankt der Patient an der Variante Niemann-Pick Typ A (schwere Verlaufsform) oder an der Variante Niemann-Pick Typ B (mildere Verlaufsform). Bei beiden Verlaufsformen sind Lipid-überladene Schaumzellen (auch als NP-Zellen bezeichnet) nachweisbar. Diese histiozytären Zellen entstehen auf Grund der Sphingomyelin-Akkumulation im monozytären Makrophagensystem. Bedingt durch Phagozytose von Plasmamembranbestandteilen ist der Einstrom an Sphingomyelin hier bekanntermaßen besonders hoch, sodass dieses Zellsystem primär von der Sphingomyelin-Speicherung betroffen ist. In Patienten mit Niemann-Pick Syndrom kann Sphingomyelin bis zu 70% der gesamten Phospholipide in einer Zelle ausmachen, normalerweise sind es 5- 20%.

Die Niemann-Pick Typ A Form (NPD A) ist von einem schnell fortschreitenden neurologischen Verfall des Betroffenen gekennzeichnet. Hinzu kommen psychomotorische Reifungsverzögerungen und Organvergrößerungen (Visceromegalie). Die Restenzymaktivität der ASM liegt deutlich unterhalb von 5% (0,15- 0,25% [139]), für gewöhnlich tritt im Alter von 3 Jahren der Tod des Patienten ein. Besonders häufig ist die Volksgruppe der Ashkenazi Juden von dieser Verlaufsform betroffen, dabei sind in einem Großteil der Patienten die Mutationen R496L (36%), L302P (24%) und fsP330 (32%) nachweisbar.

Im Gegensatz dazu, ist das Krankheitsbild der Niemann-Pick Typ B Form (NPD B) von phenotypischer Heterogenität geprägt. Die gegenüber der NPD A-Variante erhöhte Restenzymaktivität der ASM von 2- 10% führt zu deutlich geringeren neurologischen Auswirkungen und einem relativ späten Auftreten der Organvergrößerungen (Leber, Milz, Lymphknoten). Man spricht daher von einer chronischen, nichtneurophatischen Verlaufsform, bei der oftmals das Erwachsenenalter erreicht werden kann. Lediglich in einigen schweren Fällen der NPD B ist die Lunge in Mitleidenschaft gezogen, woraus schwere Komplikationen im Verlauf der Krankheit resultieren. Die NPD B-Variante tritt vorwiegend bei Menschen türkischer, arabischer oder nordafrikanischer Abstammung auf. Insbesondere die missense Mutation H421Y stellt die häufigste Niemann-Pick Mutation in Saudi Arabien dar, in Nordamerika dagegen ist die Mutation Δ R608 besonders häufig (15%) vertreten. Die Diagnose des Niemann-Pick Syndroms erfolgt durch Bestimmung der Restenzymak-

tivität der ASM in Zellen oder Gewebeextrakten. Dabei ist zu beachten, dass es einen gewissen Überlappungsbereich der Restenzymaktivität zwischen NPD A und NPD B gibt, sodass eine exakte Vorhersage der Verlaufsform allein auf diesem Ergebnis beruhend nicht möglich ist. Oftmals ist daher eine gentechnische Analyse erforderlich, um homoallelische und heteroallelische Mutationen zu identifizieren. Entsprechende Studien zeigen, dass homoallelische Mutationen fast immer zu NPD A-Variante führen, während heteroallelische Mutationen häufig in der NPD B-Variante resultieren [90, 140].

Bislang gibt es für die Niemann-Pick Erkrankung keine spezifische Therapiemöglichkeit. Es wurde unter anderem versucht, mittels Knochenmarktransplantation eine Verbesserung der Symptome zu erzielen. Dieser Ansatz dürfte jedoch die neurologischen Beeinträchtigungen der NPD A-Variante kaum lindern. Ein weiterer Therapieansatz wird mit der Enzyersatztherapie verfolgt, die sich aktuell in der klinischen Studie (Phase II) befindet. Allerdings ist auch diese Behandlungsmöglichkeit nur für die NPD B-Variante erfolgversprechend. Auch kleine Moleküle, die die Funktion chemischer Chaperone übernehmen, könnten eine Erhöhung der enzymatischen Restaktivität der ASM-Niemann-Pick-Varianten bewirken und somit ein geeignetes Therapeutikum darstellen. Wie bereits im Fall der Fabry-Krankheit (Defekt des Enzyms α -Galactosidase) gezeigt wurde, konnten die varianten Form der α -Galactosidase durch chemische Chaperone stabilisiert und teilweise vor einer Aggregation im ER und der damit einhergehenden proteolytischen Spaltung bewahrt werden [141]. Ein darauf basierendes Medikament (Migalastat) hat kürzlich die dritte Phase der klinischen Studien abgeschlossen, für die Therapie von Phenylketonurie (PKU) ist das Chaperon Sapropterin identifiziert und bereits als Arzneistoff zugelassen worden [142, 143]. Möglicherweise lassen sich auch Niemann-Pick-Varianten der ASM auf diese Weise stabilisieren und so in ihrer katalytischen Aktivität im Lysosom stimulieren. Erste dahingehende Anhaltspunkte lieferten Studien mit dem kleinen Molekül D-MAPP [144]. Voraussetzung für klinische Niemann-Pick-Studien mit chemischen Chaperonen ist das Vorhandensein exakter Strukturinformationen über die saure Sphingomyelinase, was jedoch bisher nicht der Fall ist (vergleiche Abbildung Abb. 1.8).

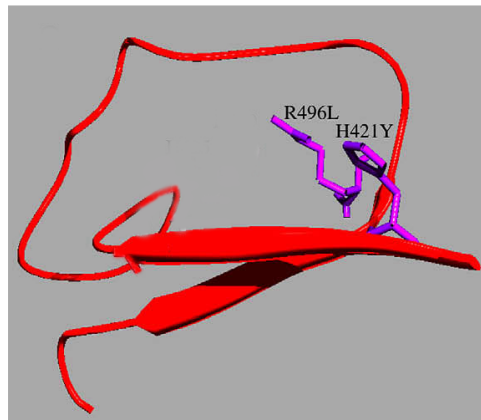


Abbildung 1.8: Modellstruktur der ASM [145]: Die Lage der Niemann-Pick-Mutationen H421Y und R496L ist gezeigt. Dabei scheint H421Y nicht in der Nähe des katalytischen Zentrums zu liegen, sondern vielmehr in der Mitte eines β -Strangs der Phosphodiesterase-Domäne in einem Zn^{2+} - Bindungsmotiv positioniert zu sein.

In der Literatur werden noch weitere Subtypen der Niemann-Pick Erkrankung beschrieben, unter anderem die Niemann-Pick Variante C. Diese komplexe Lipidspeicherkrankheit, die auf Mutationen im NPC1 oder NPC2-Protein beruht [146], führt zu einer Beeinträchtigung des Cholesteroltransports aus den späten Endosomen [147]. Folglich kommt es zu einer Fehlregulation der zellulären Cholesterolaufnahme und *de novo*-Synthese. Leber und Gehirn von Niemann-Pick Typ C Patienten zeigen Cholesterolspeicherung, zusätzlich werden aber auch Sphingomyelin, neutrale Glycolipide, GM3, GM2, BMP und Sphingosin eingelagert.

1.2.3 Weitere Sphingomyelinasen und lysosomale Hydrolasen

Die Einteilung der Sphingomyelinasen und anderer Hydrolasen des Lysosoms erfolgt, wie bereits beschrieben, klassischerweise nach dem pH-Optimum der katalytischen Aktivität. Dieser Systematik entsprechend gibt der folgende Abschnitt einen kurzen Überblick über weitere relevante Enzyme des Sphingolipid-Stoffwechsels.

Neutrale Sphingomyelinase

Im Laufe der Zeit wurden insgesamt vier verschiedene Isoformen der neutralen Sphingomyelinase (NSM) in unterschiedlichen Zellkompartimenten identifiziert. Dabei traten zum

Teil widersprüchliche Befunde hinsichtlich der zellulären Funktion und Physiologie auf. Im Jahr 1998 wurde die erste neutrale Sphingomyelinase (NSM1) beschrieben, sie wird von 432 Aminosäuren codiert und weist eine Größe von 47,6 kDa auf [148]. Um dieses Mg^{2+} -abhängige integrale Membranprotein entbrannten kontroverse Debatten, da insbesondere die Aktivität *in vitro* wichtige Eigenschaften von Sphingomyelinasen vermissen ließ. Es handelt sich daher mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit nicht um eine neutrale Sphingomyelinase, sondern vielmehr um eine lysoPAF-Phosphodiesterase [149].

Die im Jahr 2000 entdeckte zweite neutrale Sphingomyelinase (NSM2) ist das bislang am besten charakterisierte Enzym aus der Familie der neutralen Sphingomyelinasen [150]. Diese Variante wird von 655 Aminosäuren codiert und liefert ein Mg^{2+} -abhängiges 71 kDa großes Protein. Die Expression erfolgt hauptsächlich im Gehirn. Das Protein besitzt eine C-terminale katalytische Domäne und zwei hydrophobe Segmente am N-Terminus. Die Palmitoylierung in zwei Cystein-Clustern sorgt sowohl für die Stabilität des Proteins, als auch für die Lokalisation an der Plasmamembran [151]. Das Optimum der katalytischen Aktivität liegt im neutralen Bereich, für die Aktivierung des Enzyms sind anionische Phospholipide erforderlich [150], eine Inhibition hingegen kann *in vitro* und *in vivo* mit der Substanz GW4869 erzielt werden. Verschiedene Studien beschreiben eine Translokation vom Golgi-Apparat zur inneren Schicht der Plasmamembran (cytosolische Seite) nach entsprechender Stimulation [152]. Der NSM2 wird eine entscheidende Rolle bei der stressinduzierten Produktion von Ceramid zugeschrieben. Des Weiteren wird von einer Beteiligung des Enzyms bei Lungenerkrankungen, Hemmung des Zellwachstums sowie der Entstehung von Tumoren ausgegangen [153].

Eine dritte Form der neutralen Sphingomyelinase (NSM3) wurde im Jahr 2006 identifiziert [154]. Dieses 97,8 kDa große integrale Membranprotein wird von 866 Aminosäuren codiert und zeigt keinerlei Sequenzhomologie zu den anderen Mitgliedern der neutralen Sphingomyelinase-Familie. Es ist im ER lokalisiert, darüber hinaus liegen bisher keine Erkenntnisse hinsichtlich der zellulären Funktion und Physiologie des Enzyms vor.

Erst vor Kurzem wurde eine vierte neutrale Sphingomyelinase (NSM4) gefunden [155]. Dieses Enzym ist in den Mitochondrien lokalisiert und in Aufbau und Domänenstruktur vergleichbar mit der NSM2. Die katalytische Aktivität scheint die Gegenwart von Mg^{2+} oder Mn^{2+} zu erfordern. Die biologische Relevanz dieses Enzyms ist derzeit noch unbekannt.

Alkalische Sphingomyelinase

Kürzlich wurde eine alkalische Form der Sphingomyelinase in Galle und Darm identifiziert [156]. Das pH-Optimum dieser Sphingomyelinase liegt zwischen 8,5- 9,0, der isoelektri-

sche Punkt bei 6,6; zudem besteht eine Abhängigkeit der katalytischen Aktivität von Gallensalzen [157]. Das Molekulargewicht wurde auf etwa 60 kDa abgeschätzt. Es befindet sich vorrangig in den Enterocyten des Darms und in der Galle. Bisher gibt es nur wenige Erkenntnisse zur Physiologie dieses Enzyms, es wurden unter anderem antiproliferative Effekte auf Krebszellen im Dickdarm gefunden [157].

Saure Ceramidase

Die saure Ceramidase (ASAH) katalysiert die Hydrolyse von Ceramid zu Sphingosin und der entsprechenden freien Fettsäure im Lysosom bei einem pH-Wert von 4,0- 5,0. Interessanterweise findet bei einem pH-Wert von 5,5- 6,5 die Katalyse der Rückreaktion statt [158]. Das Enzym wurde erstmalig 1963 in Rattenhirn identifiziert [159], erst im Jahr 1995 gelang die Aufreinigung aus menschlichem Urin [160]. Die Vollängen-DNA-Sequenz umfasst 2312 bp, ein offener Leserahmen von 1185 bp codiert das aus 395 Aminosäuren bestehende Polypeptid [161]. Das Protein wird zunächst als Precursorform (55 kDa) synthetisiert, die anschließende proteolytische Prozessierung im Lysosom liefert das heterodimere reife Enzym (50 kDa), welches aus einer unglykosylierten α -Untereinheit (13 kDa) und einer N-glykosylierten β -Untereinheit (40 kDa) aufgebaut ist. Die beiden Untereinheiten werden demnach von derselben cDNA codiert und über Disulfidbrücken zusammengehalten [162, 163]. Für die optimale katalytische Aktivität ist die Anwesenheit von SAP D erforderlich [164, 165], eine Abhängigkeit von divalenten Kationen, wie bei der sauren Sphingomyelinase, besteht nicht.

In zahlreichen Studien wird die saure Ceramidase mit der Regulation von unkontrolliertem Zellwachstum und der Proliferation von Tumoren in Verbindung gebracht, in einigen Krebsarten konnte auch eine Fehlregulation des Enzyms in Form von erhöhter Expression nachgewiesen werden. Aus diesem Grund ist die saure Ceramidase zum Gegenstand intensiver Krebsforschung geworden. Neben der Rolle in Krebserkrankungen, ist das Enzym auch in einer Lipidose, dem Farber-Syndrom, von großer Bedeutung. Diese autosomal-rezessiv vererbte Krankheit wurde im Jahr 1957 erstmals von Sidney Farber beschrieben [166], 1972 wurde als Ursache ein Defekt der sauren Ceramidase ausgemacht [167]. Kennzeichen der Krankheit, die in mehrere Subtypen untergliedert wird, sind deformierte Gelenke, subkutane Knoten und fortschreitende Heiserkeit. Der Tod tritt im frühen Kindesalter (etwa mit 5 Jahren) ein. Das Farber-Syndrom zählt zu den seltenen Lipidosen, seit der Entdeckung 1957 wurden nur etwa 100 Fälle bekannt, insgesamt 17 Mutationen wurden bis heute identifiziert.

2 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Expression und Reinigung der humanen sauren Sphingomyelinase und repräsentativer Niemann-Pick-Varianten. Um ein möglichst breites Spektrum der Niemann-Pick Erkrankung zu erfassen, wurden hierfür die Formen R289H (Niemann-Pick Typ B), H421Y (Niemann-Pick schwerer Typ B) und R496L (Niemann-Pick Typ A) ausgewählt. Für die Expression standen verschiedene etablierte Expressionssysteme zur Verfügung, z.B. das Insektenzellsystem (*Sf9*-Zellen, *Sf21*-Zellen) oder die Säugerzellkultur (CHO-Zellen). In Anbetracht der Tatsache, dass es sich bei den varianten Formen der sauren Sphingomyelinase um potentiell faltungslabile Proteine handelt, fiel die Wahl auf das Insektenzellsystem, welches eine Expression bei 27 °C gestattet. Wie bereits im Fall der Fabry-Krankheit (Defekt des Enzyms α -Galactosidase) festgestellt wurde, zeigte die variante Form der α -Galactosidase bei 27 °C eine vergleichbare Aktivität wie das Wildtyp-Enzym. Dieses Konzept sollte nun auf die Niemann-Pick-Krankheit übertragen werden. Zunächst sollte der Expressionsvektor pFastBac-WTASM mit der cDNA des Wildtypenzyms erzeugt und in den *E. coli* Stamm DH10Bac transformiert werden. Das isolierbare Bacmid Bac-WTASM kann zum einen direkt für die Transfektion der *Sf9*-Insektenzellen eingesetzt werden. Zum anderen dient es als Start-DNA für die ortsspezifische Mutagenesereaktion, mit der die Bacmide für die varianten Formen der sauren Sphingomyelinase erhalten werden. Die aus den Bacmiden resultierenden Baculoviren führen nach erfolgreicher Infektion der *Sf 9*-Insektenzellen zur Produktion des gewünschten rekombinanten Proteins. Dieses wird in das Kulturmedium sezerniert und kann aus dem Expressionsüberstand aufgereinigt werden. Die Reinigung des Wildtyps der sauren Sphingomyelinase sollte nach den von Stephanie Lansmann entwickelten Protokollen erfolgen [168]. Diese Protokolle sollten weiterhin als Startpunkt für das neu zu entwickelnde Schema zur Reinigung der potentiell faltungslabilen Varianten genutzt und so adaptiert werden, dass die biologische Aktivität erhalten bleibt. Mittels Tangentialflussfiltration sollten die rekombinanten Proteine zunächst aufkonzentriert und in einen geeigneten Puffer überführt werden. Die sich anschließenden chromatographischen Reinigungsstufen sollten unter Ausnutzung der spezifischen Eigenschaften der Proteine, wie z.B. Glykosylierung oder Hydrophobizität, zur selektiven Anreicherung bzw. dem abschließenden Erhalt der Zielproteine (sekretorische

Form) führen.

Zudem sollte untersucht werden, ob ein alternativer Zugang zu den genannten Proteinen mittels zellfreier Proteinsynthese etabliert werden kann [169], da dies eine enorme Beschleunigung und Vereinfachung im Hinblick auf die Zugänglichkeit großer Proteinmengen darstellen würde.

Nach erfolgreicher Expression und Reinigung sollte eine umfassende enzymatische Charakterisierung der varianten Formen im Vergleich zum Wildtyp-Enzym vorgenommen werden. Insbesondere wurde ein Vergleich der Restenzym-Aktivitäten im mizellaren und liposomalen Assaysystem angestrebt. Darüber hinaus sollte in zellulären Assays mit humanen ASM-defizienten Fibroblastenzellen die Frage geklärt werden, ob es sich bei den Niemann-Pick-Varianten der ASM um faltungslabile Enzym-Varianten handelt, die einem proteolytischen Abbau unterliegen, bevor der Transport in die Lysosomen erfolgen kann. In diesem Fall könnte mit Hilfe chemischer Chaperone eine Stabilisierung der Enzyme erreicht und der Transportdefekt somit umgangen werden.

Biophysikalische Untersuchungen mit den erhaltenen rekombinanten Proteinen sollten zudem einen Beitrag zur Strukturaufklärung leisten, dies sollte mittels IR-Spektroskopie realisiert werden.

Weiterhin sollten in diversen enzymatischen Assays neue potentielle Inhibitoren der sauren Sphingomyelinase, neutralen Sphingomyelinase und der sauren Ceramidase identifiziert werden.

3 Ergebnisse und Diskussion

Biophysikalische Untersuchungen an Proteinen, wie zum Beispiel die Aufklärung von Sekundärstrukturen oder Faltungselementen, setzen in der Regel das Vorhandensein großer Mengen hochreinen Materials voraus. In bisherigen Studien wurden als Proteinquellen, insbesondere für die varianten Formen der sauren Sphingomyelinase, zumeist Lysate von Patientenzellen verwendet. Nicht immer steht jedoch ausreichend humanes Patientengewebe zur Verfügung und die Konzentration des Zielproteins in diesen Lysaten ist zudem gering. Aus diesem Grund wurde die Expression des humanen Wildtypenzyms (sekretorische ASM) sowie repräsentativer varianter Formen der sauren Sphingomyelinase im Baculovirusexpressionssystem angestrebt. Ausgewählt wurden die Varianten R289H (Niemann-Pick Typ B), H421Y (Niemann-Pick schwerer Typ B) und R496L (Niemann-Pick Typ A), da es sich hierbei um Formen handelt, die das gesamte Spektrum der Niemann-Pick Erkrankung widerspiegeln.

3.1 Expression der sauren Sphingomyelinase und varianter Formen

Das Baculovirusexpressionssystem ist ein für die rekombinante Erzeugung von glykosylierten Proteinen gebräuchliches System und wurde bereits erfolgreich für Proteine des Sphingolipidstoffwechsels, wie die saure Sphingomyelinase und die saure Ceramidase, eingesetzt [168, 170].

Die Insertion der cDNA (Wildtyp bzw. Mutante) erfolgte stromabwärts des Polyhedrinpromotors in das Baculotransferplasmid pFastBac 1 und wurde mittels Sequenzierung verifiziert. Durch Kotransfektion von serumfrei kultivierten *Sf*-9 Zellen wurden folglich rekombinante Baculoviren erzeugt. Die präparative Expression der genannten Proteine erfolgte in Suspensionskultur (Halbliter-Maßstab, 27 °C), wobei der Großteil der enzymatischen Aktivität in das Kulturmedium sezerniert wurde. Die Expression wurde 4 Tage nach Infektion durch Separation der Zellen vom Expressionsüberstand (Zentrifugation)

gestoppt. Anschließend durchliefen die Proteine einen mehrstufigen Reinigungsprozess. Die Expressionsausbeute betrug etwa 750 µg Zielprotein pro 1 L Kulturmedium.

3.2 Reinigung der sauren Sphingomyelinase und varianter Formen

Die Reinigung der sauren Sphingomyelinase (Wildtyp und Varianten) erfolgte in Anlehnung an das von S. Lansmann entwickelte Schema [168]. Durch entsprechende Adaptionen gelang es ein Reinigungsprotokoll zu etablieren, mit dem sowohl das Wildtypenzym als auch die varianten Formen in nahezu identischer Reinheit erhalten werden konnten. Alle Reinigungsschritte erfolgten in Gegenwart von 0,1 mmol/L ZnCl_2 , welches vermutlich das aktive Zentrum des Enzyms stabilisiert [109], und *n*-Octyl- β -D-glucopyranosid (β -OG), da dieses Detergenz einer Aggregation des Proteins entgegenwirkt und zudem dialysierbar ist. Auf die in der ursprünglichen Vorschrift [102] zuerst durchgeführte Ammoniumsulfatfällung wurde verzichtet, da das kommerziell erhältliche Medium (Sf-900 II SFM, Gibco) den Scherkräftminderer Pluronic F68 enthält, der eine effektive Proteinpräzipitation verhindert. Vielmehr schwimmen die Proteine als Film auf und es besteht die Gefahr der Denaturierung an der Grenzfläche. Der Konzentrationsschritt Ammoniumsulfatfällung musste somit durch die Methode der Tangentialflussfiltration ersetzt werden. Bei der Aufreinigung eines Proteins ohne Affinitätstag müssen die spezifischen Eigenschaften des Proteins in geeigneter Weise ausgenutzt werden. Im Fall der humanen sauren Sphingomyelinase handelt es sich um ein Glykoprotein, daher bietet sich eine Reinigungsstufe mit Lektinen an. Dem Prinzip liegt die mehr oder weniger spezifische Bindung von Lektinen (z.B. Concanavalin A) an terminalen Zuckerresten zu Grunde. Demnach eignet sich diese Matrix gut für die Anreicherung von Glykoproteinen, deren Zuckerbäume vom „high mannose“ Typ sind. Optimale Bindungseigenschaften zeigt Concanavalin A bei pH 7 in Mangan- und Calcium-Ionen haltigem Puffer, diese Ionen sind für die Strukturbildung der Matrix äußerst wichtig. Aus diesem Grund sollte die aufzutragende Probe einen neutralen pH Wert aufweisen. Um dies sicher zu stellen, musste der zellfreie Expressionsüberstand daher im ersten Schritt mittels Tangentialflussfiltration (Vivaflow) in einen geeigneten Puffer (Con A Waschpuffer) umgepuffert werden. Dabei wurde das Ausgangsvolumen auf etwa 20% reduziert und Fremdproteine, deren Größe 30 kDa unterschritt, gleichzeitig abgetrennt. Das Umpuffern war auch aus einem weiteren Grund zwingend erforderlich: da dem Insektenzellmedium Zucker in reichlicher Menge zugesetzt ist, muss dieser vor der Lektin-Affinitätschromatographie abgetrennt werden, anderenfalls könnte die Matrix

das gewünschte Protein nicht in ausreichender Menge binden. Unspezifisch gebundene Proteine konnten nach dem Auftragen der Probe auf die Concanavalin A Matrix durch intensives Waschen mit Con A Waschpuffer entfernt werden. Die Elution der gebundenen Glykoproteine erfolgte durch einen Methyl- α -D-mannopyranosid-Gradienten in Con A Waschpuffer durch kompetitive Verdrängung (vergleiche Abbildung Abb. 3.1).

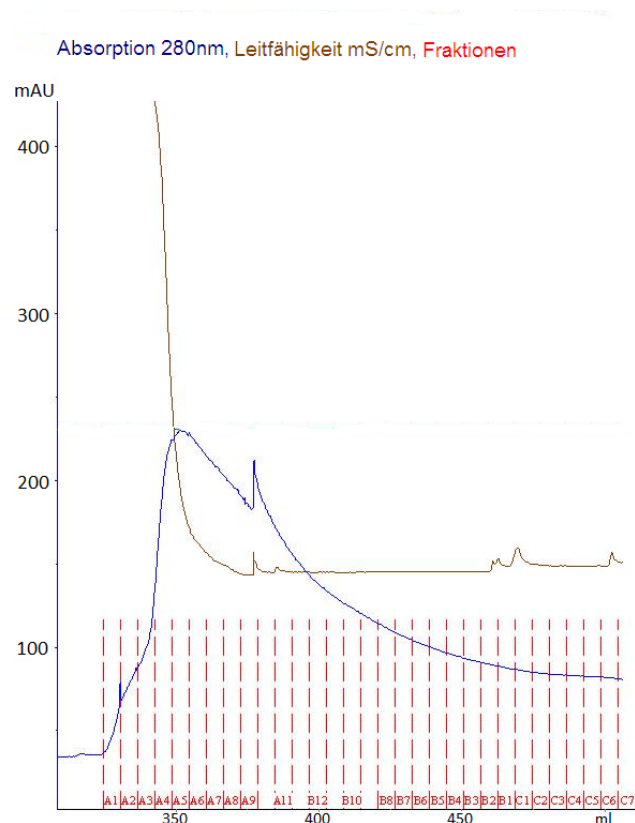


Abbildung 3.1: Ausschnitt des Elutionsprofils der Affinitätschromatographie an Concanavalin A Sepharose: die ASM-haltigen Fraktionen A2 bis C7 wurden für die nachfolgenden Reinigungsschritte vereinigt.

Das Protein lag im Eluat in relativ verdünnter Form vor und wurde daher vor dem nächsten Reinigungsschritt mit Zentrifugationsfiltern aufkonzentriert. Klassischerweise wird nach einer Affinitätschromatographie eine hydrophobe Interaktionschromatographie durchgeführt. In Vortests verschiedener hydrophober Chromatographiemedien zeigte Butyl-S Sepharose die besten Bindungseigenschaften für das vorliegende Trennproblem. Da das aufkonzentrierte Eluat der Concanavalin A Chromatographie eine zu geringe Salzkonzentration aufwies, musste die Probe vor dem Auftrag auf die Butyl-S Sepharose-Säule

den hydrophoben Bedingungen durch Zugabe von $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung angepasst werden. Das Zielprotein war nun in der Lage, über die hydrophoben Reste an die Matrix zu binden, hydrophile und schwach hydrophobe Proteine konnten dagegen durch Waschen mit Butyl-S Waschpuffer entfernt werden. Die Elution der hydrophoben Proteine erfolgte mit einem linearen Gradienten von 0- 1% (w/v) *n*-Octyl- β -D-glucopyranosid (β -OG) in Butyl-S Elutionspuffer (siehe Abbildung Abb. 3.2).

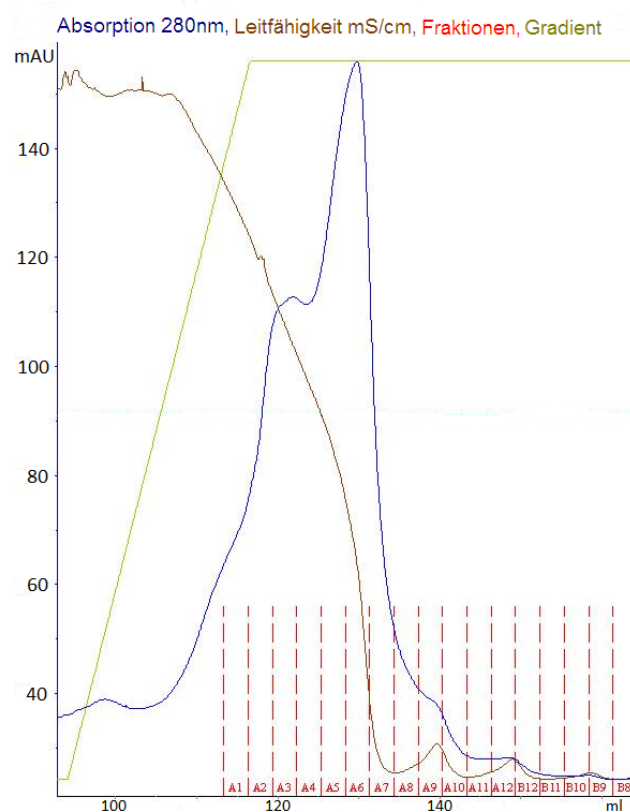


Abbildung 3.2: Ausschnitt des Elutionsprofils der hydrophoben Interaktionschromatographie an Butyl-S Sepharose Chromatographie: die ASM-haltigen Fraktionen A5 bis A12 wurden für die nachfolgenden Reinigungsschritte vereint.

Obwohl der Salzgehalt der Probe bei der Elution stark abnahm, war er mit ca. 150 mS/cm dennoch zu hoch, um mit dem Eluat direkt eine Anionenaustauschchromatographie durchführen zu können. So musste ein Zwischenschritt, die Entsalzung an Desalting Sephadex Medium, eingefügt werden. Um diesen Prozess möglichst effizient zu gestalten, wurde das Eluat der Butyl-S Interaktionschromatographie wiederum mit Zentrifugationsfiltern auf-

konzentriert, dann auf die Desalting-Säule aufgetragen und mit salzfreiem Desaltingpuffer zurückerhalten. Die Abbildung Abb. 3.3 illustriert diesen Prozess.

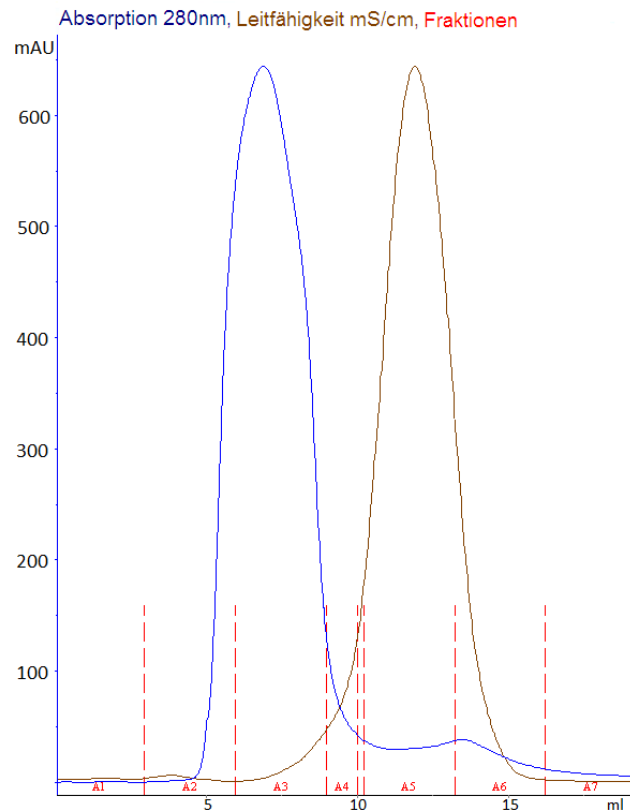


Abbildung 3.3: Ausschnitt des Elutionsprofils der Desalting Chromatographie: die ASM-haltigen Fraktionen A2 bis A4, sowie A6 und A7 wurden vereint.

Anschließend konnte die Anionenaustauschchromatographie ohne Probleme durchgeführt werden. Generell wird dieser Chromatographieschritt häufig als letzter Schritt in einem mehrstufigen Reinigungsprotokoll empfohlen (sogenannter „polishing step“), da er sehr schonend und meist konzentrierend verläuft. Nachdem in ersten Versuchen die im Originalprotokoll von S. Lansmann [168] angegebene Matrix EMD DEAE (schwacher Anionenaustauscher) nicht zum gewünschten Erfolg führte, erwies sich der Einsatz eines starken Anionenaustauschers, der Mono Q Sepharose, als Mittel der Wahl. Die im Eluat der Desaltingchromatographie enthaltenen Proteine waren in der Lage eine Bindung an die Matrix einzugehen, und das Zielprotein konnte in nahezu reiner Form mit einem linearen Gradienten von 0- 1 mol/L NaCl in Mono Q Elutionspuffer erhalten werden (vergleiche Abbildung Abb. 3.4).

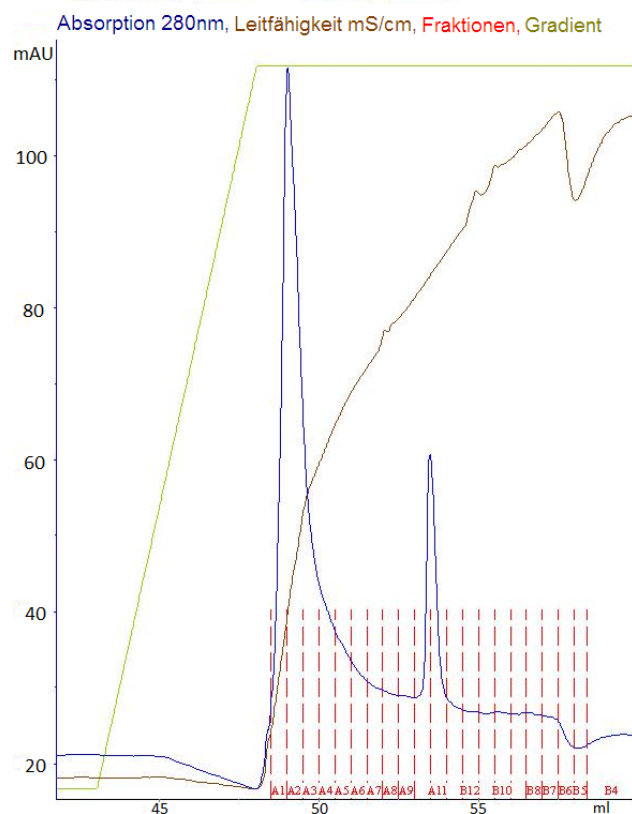


Abbildung 3.4: Ausschnitt des Elutionsprofils der Anionenaustauschchromatographie an Mono Q-Säulenmaterial: die Fraktionen A1 bis A4 zeigten eine hohe ASM-Aktivität und wurden vereint.

3.2 Reinigung der sauren Sphingomyelinase und varianter Formen

Die SDS-PAGE Analyse (siehe Abbildung Abb. 3.5) der erhaltenen Eluate der Anionenaustauschchromatographie zeigt, dass es möglich ist, mit dem beschriebenen Reinigungsschema das Wildtypenzym sowie die varianten Formen der sauren Sphingomyelinase in nahezu identischer Reinheit zu erhalten.

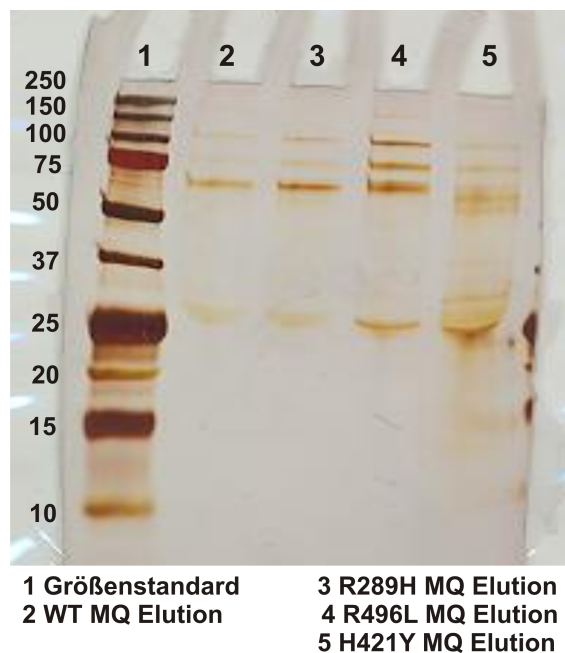


Abbildung 3.5: SDS-PAGE (Trenngel 10% AA, Sammelgel 5% AA): die Eluate der Anionenaustauschchromatographie verschiedener Expressionsansätze (WT-ASM, bzw. Varianten) wurden zur Überprüfung der Reinheit der Proteine aufgetrennt. Pro Laufspur wurde 1 µg Protein aufgetragen, die Visualisierung der Banden erfolgte durch Silberfärbung. Das Zielprotein hat eine Größe von 72 kDa, alle Proben zeigen annähernd gleiche Reinheit.

Mittels Western Blot Analyse (siehe Abbildung Abb. 3.6) konnten sowohl das Wildtypenzym als auch die varianten Formen der sauren Sphingomyelinase nachgewiesen werden. Folglich war der primäre Antikörper in der Lage an alle Proteine zu binden, die Mutationen in den ASM-Varianten hatten also offenbar keinen Einfluss auf die antigene Determinante.

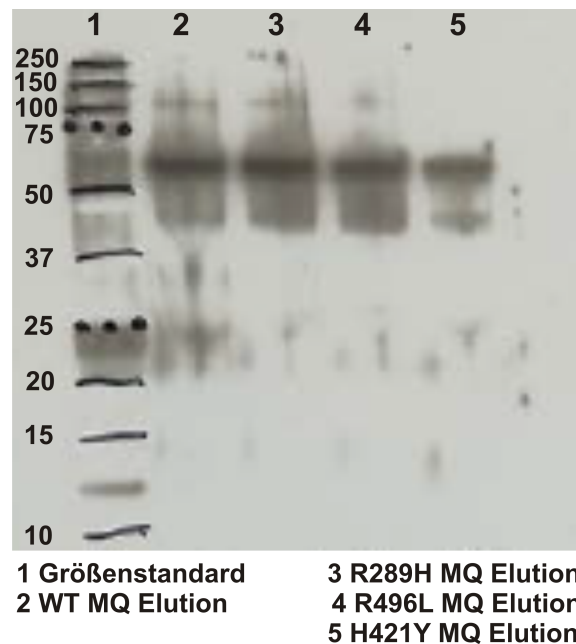


Abbildung 3.6: Western Blot: die Eluate der Anionenaustauschchromatographie wurden zum Nachweis des Zielproteins (WT-ASM, bzw. Varianten) aufgetrennt. Pro Laufspur wurde 1 µg Protein aufgetragen. Nach SDS-PAGE (Trenngel 10% AA, Sammelgel 5% AA) und anschließendem Transfer auf eine Nylonmembran wurde der erste Antikörper (anti-ASM-Ziege, polyklonal) in einer Verdünnung von 1:500 zugesetzt, der zweite Antikörper (GRP-Konjugat) wurde als 1:10000 Verdünnung eingesetzt. Der Wildtyp und alle varianten Proteine konnten detektiert werden, die Größe der enzymatisch aktiven Form beträgt 72 kDa.

3.3 Zellfreie Expression der sauren Sphingomyelinase

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Dr. Stefan Kubick (Fraunhofer IBMT) wurde ein alternatives Verfahren getestet, um an größere Mengen einer homogenen Proteinpräparation zu gelangen. Die Methode der zellfreien Proteinsynthese zeichnet sich durch eine schnelle und einfache Handhabung aus, bei der aufwendige Reinigungsschritte zur Abtrennung von Fremdproteinen in aller Regel nicht erforderlich sind [169]. Daher wurde versucht, die saure Sphingomyelinase auf diesem Weg zu erhalten. Die ersten Reaktionsschritte (Synthese der mRNA und Translation) verliefen den Erwartungen entsprechend, als problematisch erwies sich jedoch die Synthese der Disulfidbrücken im Protein. Folglich zeigte das isolierte Protein

im mizellaren Enzymassay keine biologische Aktivität, sodass die zellfreie Synthesestrategie als gescheitert angesehen werden musste.

3.4 Enzymkinetik im mizellaren Sphingomyelinase-Assay

Die Bestimmung der kinetischen Parameter der sauren Sphingomyelinase sowie der varianten Formen erfolgte im detergenzhaltigen mizellaren Assaysystem, um einen direkten Vergleich mit den von S. Lansmann durchgeführten Arbeiten [168] vornehmen zu können. Die Messung des Sphingomyelin-Abbaus bei Variation der Substratkonzentration lieferte für alle Enzyme eine Michaelis-Menten-Kinetik. Die Konstanten V_{\max} und K_M der Michaelis-Menten-Kinetik können durch geeignete Linearisierungsverfahren ermittelt werden. Als gebräuchlichste Methode ist hierbei die Auftragung nach Lineweaver-Burk zu nennen. Dabei werden die Reaktionsgeschwindigkeit und die Substratkonzentration getrennt voneinander doppelt reziprok aufgetragen, eventuelle Abweichungen von der Linearität sind gut erkennbar. Allerdings sind die Messpunkte im Plot nicht äquidistant verteilt, das heißt es kommt zu einer Stauchung der Datenpunkte in Richtung des Achsenkreuzes und somit zu einer größeren Fehlerzunahme je kleiner die Messwerte sind. Ohne Durchführung einer Fehlerstatistik kann dies zu großen Ungenauigkeiten führen. Die Beliebtheit der Darstellung nach Lineweaver-Burk beruht auf der Komprimierung der Fehlergrenzen bei entsprechend hohen Substratkonzentrationen S^{-1} . Ein ebenfalls häufig angewendetes Verfahren ist die Darstellung nach Hanes. Diese Auftragsform zeigt den Quotienten aus Substratkonzentration und Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Substratkonzentration. Der entscheidende Nachteil liegt hier in der Variablenabhängigkeit von Ordinate und Abszisse, experimentelle Fehler (z.B. beim Pipettieren) fließen somit doppelt in die Berechnungen ein. Die Abbildung Abb. 3.7 zeigt beide Linearisierungsmethoden. Mittels linearer Regression konnten die Werte für V_{\max} und K_M bestimmt werden. Die ermittelten Werte sind in Tabelle Tab. 3.1 aufgeführt. Beide Verfahren lieferten Konstanten ähnlicher Größenordnung.

Tabelle 3.1: Auswertung der kinetischen Parameter nach Lineweaver-Burk und Hanes

	Lineweaver-	Burk	Hanes	
	K_M [$\mu\text{mol/L}$]	V_{\max} [$\text{mmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$]	K_M [$\mu\text{mol/L}$]	V_{\max} [$\text{mmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$]
WT	13	0,58	24	0,91
R289H	12	1,08	13	1,00
H421Y	18	0,19	25	0,40
R496L	21	2,31	16	1,86

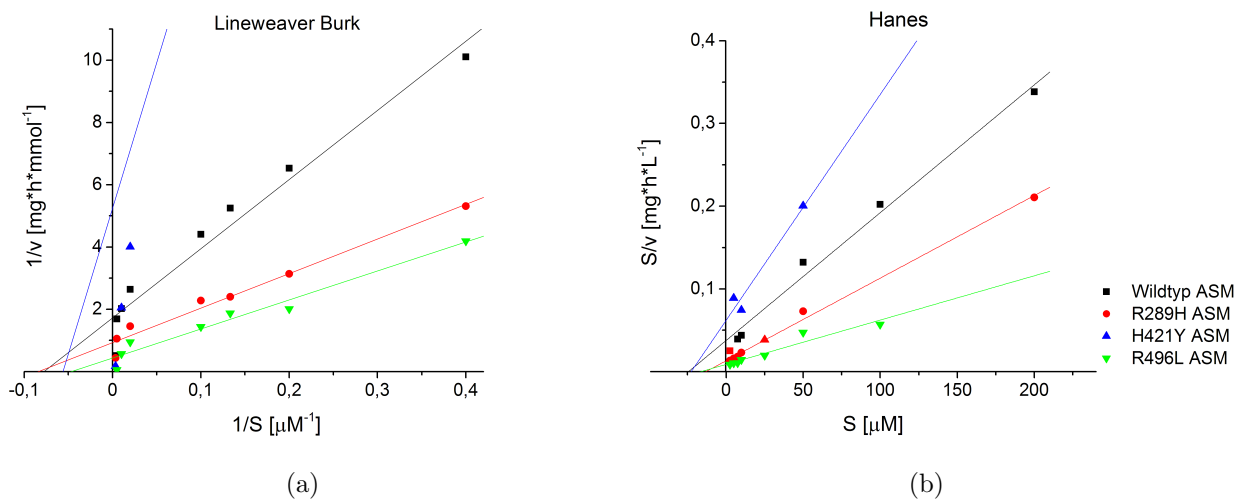


Abbildung 3.7: Enzymkinetik: Auswertung nach (a) Lineweaver-Burk, (b) Hanes, die einzelnen Parameter sind Tabelle Tab. 3.1 zu entnehmen. Die spezifische Aktivität der Enzyme wurde im mizellaren Testsystem bei pH 5 mit steigender Konzentration des Substrats Sphingomyelin gemessen. Angegeben sind die Mittelwerte von Doppelbestimmungen.

Die Michaelis-Menten-Konstante K_M ist eine für ein bestimmtes Enzym charakteristische Größe und hat die Dimension einer Konzentration. Sie ist als Substratkonzentration ($\mu\text{mol/L}$) bei halbmaximaler Reaktionsgeschwindigkeit definiert und gibt somit die Substratkonzentration an, bei der die Hälfte aller aktiven Zentren des an der Reaktion beteiligten Enzyms besetzt sind. K_M spiegelt daher in gewissem Maße die Affinität eines Enzyms zu seinem Substrat wieder, dabei entspricht ein kleiner Zahlenwert einer festen Bindung zwischen Enzym und Substrat. Die eingesetzte Enzymmenge hat dabei keinen Einfluß auf K_M .

Wie aus Tabelle Tab. 3.1 ersichtlich ist, liegt der ermittelte K_M -Wert des Wildtyp-Enzyms entsprechend der Darstellung nach Lineweaver-Burk bei $13 \mu\text{mol/L}$ und befindet sich so-

mit im Fenster der in der Literatur zu findenden Werte von 2 bis 500 $\mu\text{mol/L}$. Allerdings zeigt er eine relativ deutliche Abweichung zum Literaturwert von 32 $\mu\text{mol/L}$ nach [168]. Da vermutlich alle nach dieser Linearisierungsmethode bestimmten Werte eine ähnlich starke Abweichung aufweisen, scheint die Lineweaver-Burk-Darstellung in diesem Fall keine günstige Wahl zu sein. Dennoch bewegen sich die kinetischen Parameter in der gleichen Größenordnung und zeigen dieselben Tendenzen, wie die nach der Hanes-Methode erhaltenen Werte. Der im Hanes-Plot ermittelte K_M -Wert für das Wildtyp-Enzym von 24 $\mu\text{mol/L}$ entspricht dagegen im Rahmen der Messungenauigkeit des Assays dem in der Literatur beschriebenen Wert nach [168]. Für die Variante H421Y wurde ein geringfügig höherer Wert ermittelt, während die anderen Varianten niedrigere K_M -Werte lieferten. Daraus kann man schlussfolgern, dass Variante H421Y das Substrat Sphingomyelin ein wenig schwächer bindet als das Wildtypenzym, während die Varianten R289H und R496L eine festere Bindung eingehen. Möglicherweise führt die veränderte Aminosäuresequenz und die resultierende punktuelle Ladungsänderung in den jeweiligen Proteinen zu einer leichten Veränderung der räumlichen Anordnung in der entsprechenden Umgebung der Mutation. Als Folge dessen könnte die Anbindung des Substrats beeinträchtigt sein, z.B. durch das Hereinragen von Aminosäureresten in die Bindungstasche (schwächere Substratbindung durch sterische Hinderung) oder Aufweitung der Bindungstasche (festere Substratanbindung, da mehr Bindungspartner als üblich für die Wechselwirkung mit dem Substrat zur Verfügung stehen könnten).

Dies spiegeln auch die Reaktionsgeschwindigkeiten wider: Variante H421Y hat eine deutlich geringere Reaktionsgeschwindigkeit, Variante R289H zeigt eine etwa gleiche und Variante R496L sogar eine gegenüber dem Wildtyp-Enzym erhöhte Reaktionsgeschwindigkeit.

Bedingt durch die relativ hohe Enzymkonzentration im Assay fallen die Werte für V_{\max} etwas geringer aus als zu erwarten gewesen wäre (vergleiche [168] für das Wildtyp-Enzym), sie befinden sich aber im Rahmen der in der Literatur angegebenen Spanne von 0,0135 – 1,3 $\text{mmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Dies musste in Kauf genommen werden, um auch für die weniger reaktiven Varianten noch einen ausreichenden Substratumsatz (10- 20%) zu gewährleisten, wie der entsprechende Vortest (vergleiche Abbildung Abb. 3.8(a)) bereits nahelegte.

In einem vergleichenden Assay wurde in Form einer Parallelmessung die spezifische Aktivität des Wildtypenzyms und des von S. Lansmann hergestellten Enzyms [168] bestimmt. Beide Proben zeigten gleiche Abbauraten an Sphingomyelin, die spezifische Aktivität betrug demnach 0,796 $\text{mmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ (Literaturwert der spezifische Aktivität: 0,800 $\text{mmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) und konnte somit im Rahmen der Messungenauigkeit des Assays als reproduziert angesehen werden.

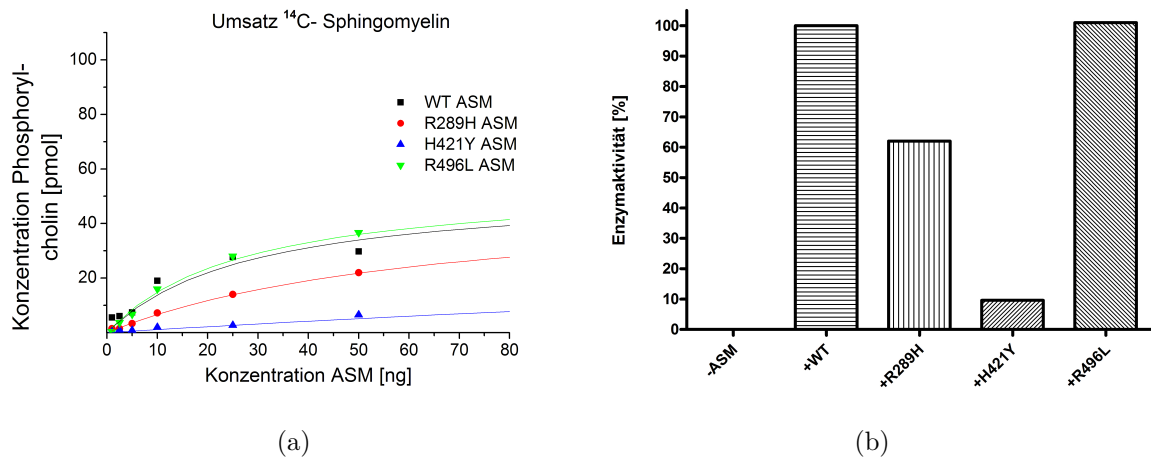


Abbildung 3.8: Umsatz an Sphingomyelin im mizellaren Assaysystem (a): Zunahme der Konzentration an Phosphorylcholin durch Abbau von Sphingomyelin bei Variation der Enzymmenge (WT-ASM, bzw. Varianten). Bei einer Enzymkonzentration von 25 ng zeigen alle Enzyme vergleichbare Umsatzaktivität, Ausnahme ist die Variante H421Y, deren Aktivität deutlich geringer ist. (b): die Aktivität des Wildtypenzyms (25 ng) wurde auf 100% Substratumsatz normiert.

3.5 Liposomaler Sphingomyelinase-Assay

Im liposomalen, detergentfreien Assaysystem korreliert die Aktivität der Enzyme mit ihrer Fähigkeit, das in eine Lipidmembran eingebettete Substrat Sphingomyelin binden zu können und anschließend umzusetzen. Dies ist ein wesentlicher Unterschied zum mizellaren Sphingomyelinase-Assay.

Die Liposomen, welche aus definierten Lipiden zusammengesetzt sind, simulieren dabei membranähnliche Doppelschichten und stellen somit ein Modellsystem für die späten Endosomen bzw. Lysosomen der Zelle dar. Als besonders geeignet erwiesen sich hierbei anionische Liposomen mit einem 20% igen Anteil von PC ([126]). Mit Hilfe dieses Assayssystems sollte untersucht werden, ob die Varianten der sauren Sphingomyelinase (WT, R289H, H421Y, R496L) verschiedene Faltungsformen aufweisen, welche möglicherweise zu einer veränderten Anbindung der Enzyme an die Liposomen führen und dementsprechend Unterschiede in den Aktivitäten resultieren. Der ermittelte Substratumsatz ist Abbildung Abb. 3.9 zu entnehmen, für das Wildtyp-Enzym wurde er auf 100% normiert. Eine abgeschwächte Aktivität war bei den Varianten R289H (70%) und H421Y (1%) festzustellen, die Variante

R496L hingegen zeigte eine leicht erhöhte Aktivität (105%). In Abbildung Abb. 3.9(a) ist ein typisches Dünnschichtchromatogramm dargestellt.

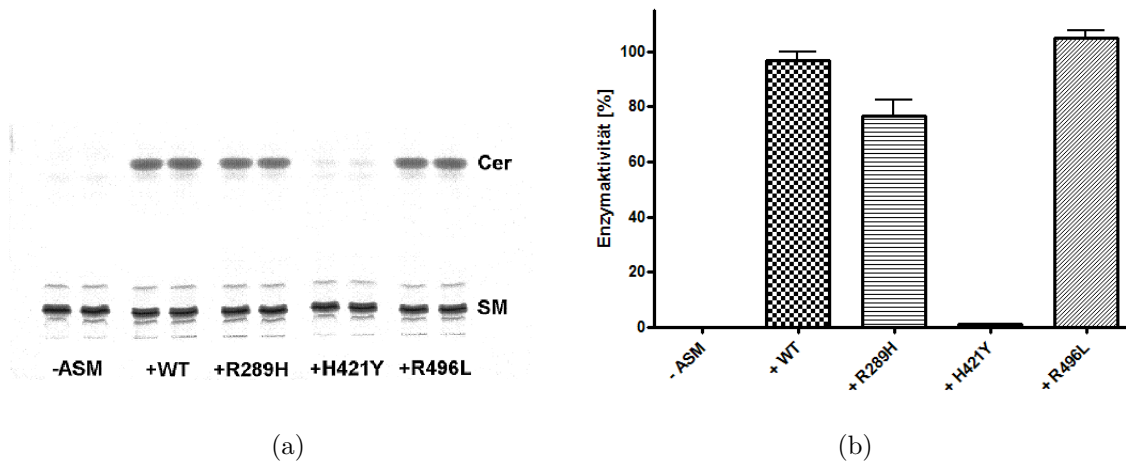


Abbildung 3.9: Umsatz an Sphingomyelin im liposomalen Assaysystem (a): Zusammensetzung der Liposomen 60 mol% DOPC, 10 mol% Chol, 20 mol% DPPA, 9,5 mol% ^{12}C -SM, 0,5 mol% ^{14}C -SM; Enzymkonzentration 500 ng, Inkubationszeit 60 min, 37 °C; Puffer 20 mmol/L Natriumcitrat, 150 mmol/l NaCl, pH 5,0; die Aktivität des Wildtypenzym wurde auf 100% Substratumsatz normiert (b).

Die gezeigten Ergebnisse machen deutlich, dass sowohl der mizellare, als auch der liposomale Assay die komplexe Realität des Sphingomyelin-Abbaus in lebenden Zellen nicht vollständig wiedergeben können. Wie bereits im Jahr 1994 von T. Levade aufgezeigt [139], besteht dieses Problem auch häufig bei der Bestimmung von Restenzymaktivitäten varianter Sphingomyelinase-Formen in Niemann-Pick-Patientenzellen. In aller Regel liegen die ermittelten Restenzymaktivitäten (REA) deutlich über den tatsächlich vorhandenen effektiven Restenzymaktivitäten und können somit nicht in Einklang mit dem Krankheitsbild gebracht werden. Diese Differenzen sind meist auf methodische Limitationen zurückzuführen, für eine exakte Messung der Restenzymaktivität müsste die Bestimmung in intakten, lebenden Zellen unter Verwendung des natürlichen Substrats (z.B. radioaktiv markiert) erfolgen.

Die im mizellaren und liposomalen Assaysystem bestimmten enzymatischen Restaktivitäten für die ASM-Varianten R289H von 70%- 60% (Niemann-Pick Typ B, REA: 2- 10%) bzw. annähernd 100% bei der Variante R496L (Niemann-Pick Typ A, REA: 0,15- 5%) spiegeln diese Problematik wider. Einzig die Restenzymaktivität der Variante H421Y (schwerere

Niemann-Pick Typ B) liegt mit 9%- 1% im zu erwartenden Bereich. Offenbar geht der Verlust der katalytischen Aktivität der Niemann-Pick-Varianten R289H und R496L, welcher in den Patientenzellen zu verzeichnen ist, hier nicht mit einer drastischen Änderung der kinetischen Parameter der isolierten Enzyme einher. Generell ist die Erzeugung verlässlicher kinetischer Daten schwierig, wie anhand der großen Bandbreite der in der Literatur vorzufindenden Werte für V_{\max} und K_M deutlich wird (siehe oben). Da die im mizellaren und liposomalen Assaysystem ermittelten Restenzymaktivitäten der ASM-Varianten eine große Übereinstimmung aufweisen, kann jedoch davon ausgegangen werden, dass die Kinetik zumindest in der Tendenz korrekt wiedergegeben wird. Es ist daher anzunehmen, dass die drastisch reduzierte Enzymaktivität in Niemann-Pick-Patienten durch weitere beeinflussende Faktoren zu Stande kommt. Hierzu könnte unter anderem eine verminderte Sekretion der varianten Enzyme aufgrund von Fehlfaltung oder die Aggregation in bestimmten Zellkompartimenten, wie dem ER, zählen. In diesen Fällen können die varianten Enzyme ihren eigentlichen Bestimmungsort, das Lysosom, nicht in ausreichender Menge erreichen und folglich keine ausreichende katalytische Funktion ausüben. Möglicherweise ließe sich der geschilderte Transportdefekt durch die Gabe von chemischen Chaperonen beheben.

3.6 Bestimmung der Restenzymaktivitäten in humanen ASM-defizienten Fibroblastenzellen

Auf Grund der beschriebenen Differenzen zwischen den Restenzymaktivitäten der isolierten varianten Sphingomyelinase-Formen und den aus entsprechenden Patientenzellen bekannten Werten, sollte in zellulären Assays der Frage nachgegangen werden, inwieweit die varianten Enzyme in der Lage sind, katalytische Aktivität im Lysosom auszuüben. Dazu wurden humane ASM-defiziente Fibroblastenzellen (NPA -/-) mit radioaktiv markiertem L(3- ^{14}C)Serin vorinkubiert und anschließend mit den gereinigten Enzymen (WT, R289H, H421Y oder R496L) versetzt. Nach dem Aufschluss der Zellen werden alle radioaktiv markierten Lipide isoliert und mittels Dünnschichtchromatographie voneinander getrennt. Der Anteil des isolierten Sphingomyelins sollte dabei entsprechend der Restenzymaktivität der zugegebenen Enzyme variieren und eine Abstufung in Korrelation zum Niemann-Pick Krankheitstyp ergeben.

In einem Parallelversuch wurde mit radioaktiv markiertem Sphingomyelin gleichermaßen verfahren, allerdings bestanden hierbei Zweifel, ob die (NPA -/-) Fibroblastenzellen, die bekanntermaßen bereits eine gewisse Sättigung an Sphingomyelin durch den Speicherphänotyp aufweisen, zusätzliches exogenes Sphingomyelin gut aufnehmen würden. In der Tat

3.6 Bestimmung der Restenzymaktivitäten in humanen ASM-defizienten Fibroblastenzellen

führte diese Versuchsreihe zu keinen neuen plausiblen Erkenntnissen.

In einer weiteren Versuchsreihe wurden die Fibroblastenzellen mit L(3-¹⁴C)Serin, den gereinigten Enzymen (WT, R289H, H421Y oder R496L) sowie dem lysosomalen Proteaseinhibitor Leupeptin inkubiert. Unter der Annahme, dass alle Enzyme von den Zellen aufgenommen und in die Lysosomen transportiert werden [145], sollte Leupeptin durch Inhibition der dort befindlichen Proteasen einen Abbau der zugeführten Sphingomyelinaseformen (WT-Enzym bzw. Varianten) verhindern. Der Anteil an gespeichertem Sphingomyelin sollte gegenüber nicht mit Leupeptin behandelten Zellen reduziert sein, da die Verlängerung des Lebenszyklus eines Enzymmoleküls mit einem vermehrten Sphingomyelin-Abbau einhergeht. Sollte sich der Speicherungsgrad an Sphingomyelin zwischen Zellen, die mit dem Wildtypenzym behandelt wurden und solchen, denen die varianten Formen zugeführt wurden jedoch zusätzlich angleichen, so ist dies als Hinweis auf einen proteolytischen Abbau von Sphingomyelinase-Varianten in Niemann-Pick-Patientenzellen zu deuten. Demnach könnten die Punktmutationen im Gen der sauren Sphingomyelinase, die zu einer veränderten Aminosäuresequenz und somit zu einer reduzierten enzymatischen Aktivität führen, zwar eine Expression und den korrekten Transport des Enzyms in die Lysosomen erlauben, danach aber den schnellen lysosomalen proteolytischen Abbau zur Folge haben. Gründe hierfür könnten in veränderten Faltungsstrukturen der Sphingomyelinase-Varianten liegen, die möglicherweise eine Wechselwirkung des Enzyms mit der inneren lysosomalen Membran erschweren, sodass das ungebundene Enzym von lysosomalen Proteasen erkannt und abgebaut wird. Es ist jedoch auch vorstellbar, dass die veränderte Aminosäuresequenz in einer gestörten Anbindung des Substrats Sphingomyelin resultiert oder aufgrund einer Faltungsvariation die Wechselwirkung des Enzyms zu seinen Lipidaktivatoren (z.B. BMP) vermindert ist. In diesen beiden Fällen würde die Gabe von Leupeptin keinen Einfluss ausüben und der katalytische Zyklus nach wie vor nur in stark beeinträchtigter Weise ablaufen. Somit würde keine Angleichung des Sphingomyelin-Speicherungsgrades in behandelten und unbehandelten Zellen erfolgen. Die Abbildung Abb. 3.10 zeigt die Ergebnisse der metabolischen Markierung humaner (NPA -/-) Fibroblastenzellen mit L(3-¹⁴C)Serin und anschließender Gabe der gereinigten Sphingomyelinaseformen (WT, R289H, H421Y oder R496L) sowie den Einfluss des Leupeptins.

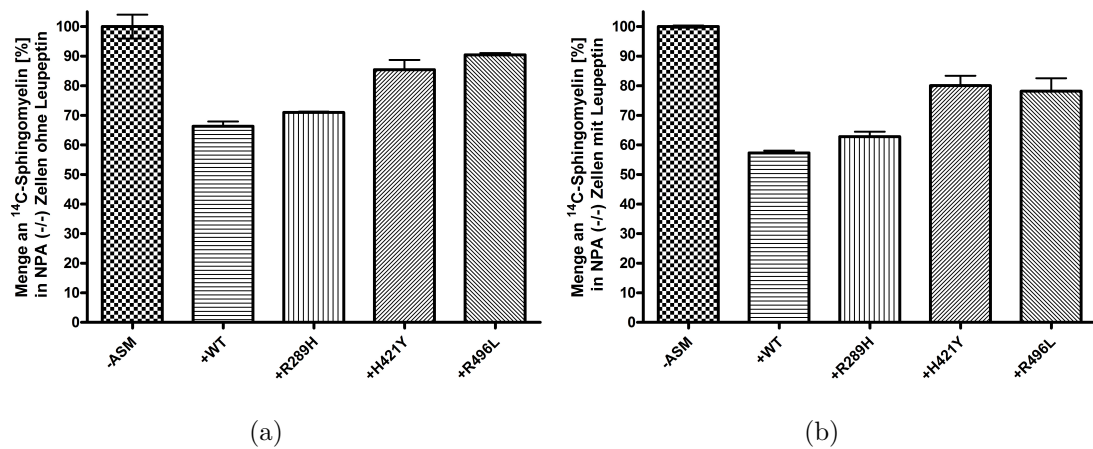


Abbildung 3.10: Bestimmung der Menge an ¹⁴C- Sphingomyelin in humanen (NPA -/-) Fibroblastenzellen nach pulse-chase mit L(3-¹⁴C)Serin und Zugabe von gereinigten Sphingomyelinaseformen (150 µg WT, R289H, H421Y oder R496L, Inkubationszeit 48 Stunden) ohne (a) und mit Leupeptin-Zusatz (b), als Bezugspunkt für die Normierung der ¹⁴C-SM-Menge wurden Enzym-unbehandelte (NPA -/-) Fibroblasten verwendet; als Kontrolle dienten humane WT-Fibroblasten (NPA +/+), sie zeigten im Vergleich zu den (NPA -/-) Fibroblasten eine um 21% geringere ¹⁴C-SM-Konzentration.

Wie bereits von Jones [145] gezeigt, findet die Expression der Niemann-Pick-Formen (u.a. H421Y und R496L) der sauren Sphingomyelinase normal statt, Hinweise auf einen fehlgeleiteten Transport der varianten Enzyme oder ein Zurückbleiben in bestimmten Zellkompartimenten (z.B. dem ER) konnten bislang nicht gefunden werden. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass insbesondere im Fall der Variante R289H dennoch eine Aggregation des Enzyms bzw. ein Defekt auf dem Transportweg in das Lysosom vorliegt, wie es bereits bei der Fabry-Erkrankung beobachtet wurde [141].

Die beschriebenen Versuche mit den (NPA -/-) Fibroblastenzellen zeigen, dass die Zugabe von gereinigten Sphingomyelinaseformen (WT, R289H, H421Y oder R496L) den Sphingomyelin-Metabolismus stimulieren, die Menge an radiomarkiertem Sphingomyelin sinkt im Vergleich zur Enzym-unbehandelten Kontrolle bei Gabe des Wildtypenzym um 34%. Bei den Varianten der ASM nimmt die Sphingomyelinmenge weniger stark ab, die Gabe von R289H führt zu einer Reduktion um 30%, bei der Variante H421Y um 15% und bei Zugabe von R496L um nur 10%. Die gefundene Abstufung steht von der Tendenz her im Einklang mit den entsprechenden Phänotypen der Niemann-Pick-Erkrankung. Der Zusatz von Leupeptin hat auf die Aktivität der sauren Sphingomyelinase in Enzym-unbehandelten

3.6 Bestimmung der Restenzymaktivitäten in humanen ASM-defizienten Fibroblastenzellen

(NPA -/-) Fibroblasten keinen signifikanten Einfluss. In (NPA -/-) Fibroblasten, die mit Sphingomyelinaseformen (WT, R289H, H421Y oder R496L) versetzt wurden, konnte dagegen ein Anstieg des Sphingomyelin-Abbaus verzeichnet werden. Zwischen Zellen, die mit dem Wildtypenzym und der Variante R289H behandelt wurden, ist dabei nahezu kein Unterschied bezüglich der Menge an ^{14}C -Sphingomyelin festzustellen (Rückgang von 66% auf 57% bzw. 71% auf 63% der ^{14}C -SM-Menge im Vergleich zur Leupeptin-unbehandelten Kontrolle). Hingegen führt die Gabe der Variante H421Y lediglich zu einer Reduktion der ^{14}C -SM-Menge von 87% auf 80%. Bedauerlicherweise sind die Schwankungen der Messwerte, die bei den Versuchen mit der Variante R496L auftraten zu groß, um an dieser Stelle eine eindeutige Aussage treffen zu können. Die Menge an ^{14}C -SM sank von 93% auf 78%, das entspräche einem Rückgang von 15% und läge damit über dem für das Wildtypenzym bestimmten Rückgang. Abschließend bleibt festzuhalten, dass alle Sphingomyelinaseformen (WT, R289H, H421Y oder R496L) katalytische Aktivität im zellulären Assay mit (NPA -/-) Fibroblasten zeigten, dabei war bei den varianten Formen eine reduzierte enzymatische Aktivität zu verzeichnen. In Anbetracht der Tatsache, dass die Variante R289H (Niemann-Pick Typ B) im mizellaren und liposomalen Assaysystem eine katalytische Aktivität von etwa 65% des Wildtypenzyms aufwies und auch im zellulären Assay eine vergleichbare Aktivität zu beobachten war, kann in diesem Fall tatsächlich ein Transportdefekt des Enzyms in Niemann-Pick-Patienten nicht ausgeschlossen werden. Möglicherweise kommt es aufgrund von Fehlfaltung zur verminderten Sekretion oder Aggregation des varianten Enzyms und somit zum vorzeitigen proteolytischen Abbau. Die kleine Menge, die dennoch ins das Lysosom transportiert werden kann, gewährleistet dann die beschriebene Restenzymaktivität von 2- 10%. Die experimentellen Befunde mit Leupeptin legen die Vermutung nahe, dass im Lysosom kein vermehrter proteolytischer Abbau dieses varianten Enzyms stattfindet. Es ist daher vorstellbar, den Transportdefekt dieser Variante mit Hilfe von chemischen Chaperonen umgehen zu können. Im Gegensatz dazu zeigte die Variante H421Y (schwerer Niemann-Pick Typ B) sowohl in mizellaren und liposomalen Assays als auch in zellulären Experimenten eine stark verminderte Abbaurate an Sphingomyelin. Dies lässt sich aller Wahrscheinlichkeit nach nicht allein durch Transportdefekte erklären, vielmehr dürften hier auch die beschriebenen störenden Effekte bei der Bindung des Substrats oder der Lipidaktivatoren bzw. proteolytischer Abbau der Variante im Lysosom zum Tragen kommen. Ein gravierender Unterschied besteht zwischen der Aktivität der Variante R496L (Niemann-Pick Typ A) im mizellaren und liposomalen Assaysystem (annähernd 100%) und dem Verhalten im zellulären Assay, wo ohne Leupeptin-Zugabe die Menge an Sphingomyelin fast der in der Enzym-unbehandelten Kontrolle entspricht. Eine naheliegende Schlussfolgerung wäre auch hier das Auftreten eines vorzeitigen proteolytischen Abbaus bzw. Transportdefektes

für das fehlgefaltete variante Enzym, sie steht allerdings im Widerspruch zu den von Jones [145] Ergebnissen. Auch ein proteolytischer Abbau im Lysosom ist nicht auszuschließen. Aufgrund der momentanen Datenlage können aber keine eindeutigen Rückschlüsse gezogen werden.

Es ist außerdem zu beachten, dass die vorgestellten Ergebnisse eine gewisse Unschärfe aufweisen, da für die Bestimmung des Sphingomyelingehalts die Fibroblastenzellen komplett aufgeschlossen wurden. Eine noch größere Übereinstimmung zum Niemann-Pick-Krankheitsbild könnte vermutlich durch Isolation der Lysosomen und anschließender Bestimmung der Sphingomyelinkonzentration erzielt werden. Ebenfalls hilfreich hinsichtlich der Vergleichbarkeit der verschiedenen Sphingomyelinaseformen untereinander wäre die Bestimmung der Enzym-Aufnahmerate in den Fibroblastenzellen gewesen (Methode nach [171]). Aufgrund des hohen experimentellen Aufwands insbesondere bei der Radiomarkierung der Sphingomyelinaseformen konnten derartige Untersuchungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht realisiert werden. Diese weiterführenden Experimente stellen jedoch einen vielversprechenden Startpunkt für zukünftige Studien auf diesem Forschungsgebiet dar, ebenso wie der Einsatz von chemischen Chaperonen in zellulären Assays.

3.7 Reinigung weiterer Hydrolasen des Sphingolipid-Katabolismus

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden ebenfalls chromatographische Reinigungen der neutralen Sphingomyelinase und der sauren Ceramidase vorgenommen. Die erhaltenen Enzyme wurden anschließend in verschiedenen Assays zum Screening diverser potentieller Inhibitoren eingesetzt. Eine Zusammenstellung der erfolgreichen Inhibitoren ist in den Publikationen zu finden [172, 173].

3.8 IR-Spektroskopie der sauren Sphingomyelinase und varianter Formen

Seit ca. 1950 ist bekannt, dass die Infrarotspektroskopie die Möglichkeit bietet an Informationen über die Sekundärstruktur von Proteinen zu gelangen. Im Wesentlichen gibt es neun verschiedene infrarotaktive Schwingungen, die vom Rückgrat eines Proteins hervorgerufen werden (Amid A, B sowie Amid I bis VII) [174]. Die Mehrzahl der strukturellen Informationen können jedoch durch die Analyse der Absorption der Amid I Bande (1700 cm^{-1} bis 1600 cm^{-1}) erhalten werden. Diese Bande resultiert zu 80% aus der C=O-Streckschwingung der Peptidbindung. Da die C=O-Gruppe im Peptidrückgrat eines Proteins in den unterschiedlichen Strukturkomponenten an Wasserstoffbrückenbindungen variabler Bindungsstärke beteiligt ist, führt dies zu verschiedenen Lagen der Amid I Bande für bekannte Sekundärstrukturelemente wie z.B. α -Helix, β -Faltblatt, Turns oder ungeordnete Strukturen. Die Infrarotspektroskopie bietet somit die Möglichkeit, Einsicht in die statische Proteinstruktur in Lösung (native Umgebung) ohne Einschränkung hinsichtlich der Molekülmasse zu erhalten. Zudem können Änderungen der Sekundärstruktur, wie sie z.B. durch Variation von äußeren Parametern (Temperatur, pH-Wert, Druck, Lösungsmittel) hervorgerufen wird, detektiert werden.

Die Messungen erfolgten gemeinsam mit Dr. Eglof Ritter am IFS 66v/S IR-Spektrometer (Bruker Optik GmbH, Ettlingen Deutschland) der Arbeitsgruppe F. Bartl (Institut für Medizinische Physik und Biophysik, Charité-Universitätsmedizin Berlin). Mit Hilfe thermischer IR-Messungen sollten dabei mögliche Rückschlüsse auf die Faltungstabilität der varianten Sphingomyelinaseformen im Vergleich zum Wildtypenzym gezogen werden.

Die aus den Expressionsansätzen erhaltenen Mono Q-Eluat (siehe Kapitel **7.3.2**: Anionenaustauschchromatographie der sauren Sphingomyelinase) mussten für die IR-Spektroskopie zunächst mit Zentrifugationsfilter (Amicon Ultra 2, 30.000 MWCO) in einen geeigneten deuterierten Probenpuffer (10 mmol/L Tris/DCl in D_2O , 0,1 mmol/L ZnCl_2 , 0,1% (w/v) β -OG, pH 7,2) umgepuffert und aufkonzentriert (1 mg/mL) werden. Anschließend wurden die Proteinlösungen (Probenvolumen $10\text{ }\mu\text{L}$) blasenfrei zwischen CaF_2 Fenstern in einer beheizbaren Transmissionszelle platziert, die Referenzzelle wurde mit dem genannten Probenpuffer befüllt. Die thermische Denaturierung wurde durch Aufheizen der Proben von 25°C auf 88°C in 10°C Schritten induziert. Die Spektren wurden im rapid scanning mode aufgenommen. Zur Auswertung wurde nur der Bereich der Amid I Absorption herangezogen. Die Abbildungen Abb. 3.11 bis Abb. 3.14 zeigen die entsprechenden Spektren.

3 Ergebnisse und Diskussion

Beim Wildtypenzym WT-ASM verschiebt sich mit zunehmender Temperatur das Absorptionsmaximum von 1641 cm^{-1} (28°C) zu höherer Wellenzahl 1646 cm^{-1} (88°C). Zusätzlich treten Schultern bei 1681 cm^{-1} und 1619 cm^{-1} auf.

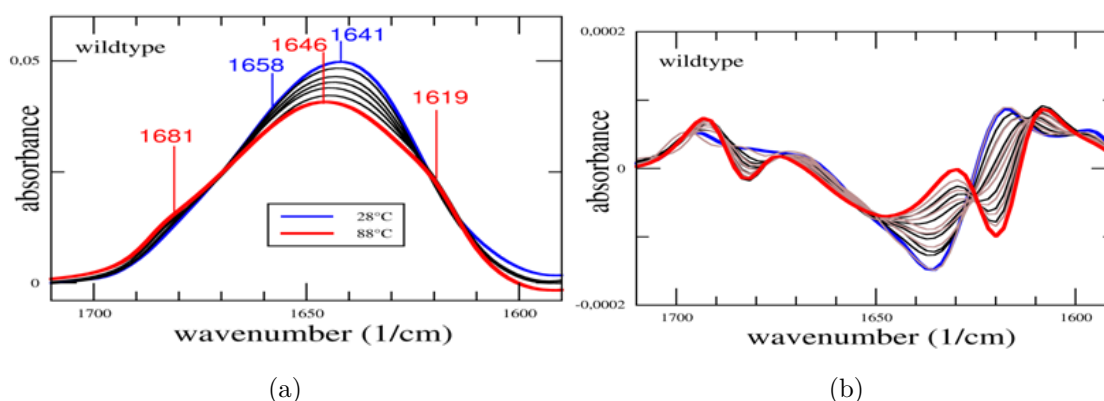


Abbildung 3.11: FT-IR-Spektrum Amid I Region von nativem (blau) und thermisch denaturiertem (rot) WT-Protein in Probenpuffer 10 mmol/L Tris/DCI in D_2O , 0,1 mmol/L ZnCl_2 , 0,1% (w/v) β -OG, pH 7,2, Konzentration der Probe (WT-ASM) 1 mg/mL, Probenvolumen $10\text{ }\mu\text{L}$, Verwendung von CaF_2 Fenstern, der Aufheizprozess erfolgte in Schritten von 10°C im Temperaturbereich von 25°C bis 88°C (a) Normalspektrum, (b) zweite Ableitung.

Das Spektrum der Variante ASM-R289H weist eine Verschiebung des Absorptionsmaximums von 1643 cm^{-1} (28°C) zu 1648 cm^{-1} (88°C) auf. Weiterhin werden bei ansteigender Temperatur kleine Schultern bei 1683 cm^{-1} und 1617 cm^{-1} sichtbar.

Für die Variante ASM-H421Y liegt der maximale Absorptionsbereich bei 28°C zwischen 1637 cm^{-1} und 1655 cm^{-1} (vergleiche Abb. 3.13). Mit zunehmender Temperatur tritt eine Abflachung und gleichzeitige Verbreiterung dieses Bereiches auf (1637 cm^{-1} bis 1671 cm^{-1}). Außerdem ist die Ausbildung einer deutlichen Schulter bei 1618 cm^{-1} zu beobachten.

Das Spektrum der Variante ASM-R496L (vergleiche Abb. 3.14) weist bei 28°C ebenfalls einen maximalen Absorptionsbereich von 1637 cm^{-1} bis 1655 cm^{-1} auf. Auch hier ist mit zunehmender Temperatur eine Abflachung und Verbreiterung dieses Bereiches von 1637 cm^{-1} bis 1670 cm^{-1} zu verzeichnen. Ebenso ist eine ausgeprägte Schulter bei 1617 cm^{-1} erkennbar.

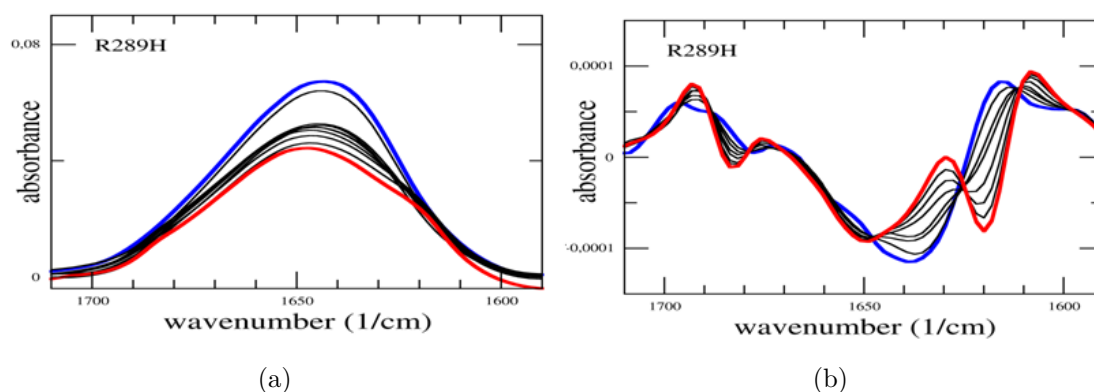


Abbildung 3.12: FT-IR-Spektrum Amid I Region von nativem (blau) und thermisch denaturiertem (rot) R289H-Protein in Probenpuffer 10 mmol/L Tris/DCl in D₂O, 0, 1 mmol/L ZnCl₂, 0,1% (w/v) β -OG, pH 7,2, Konzentration der Probe (ASM-R289H) 1 mg/mL, Probevolumen 10 μ L, Verwendung von CaF₂ Fenstern, der Aufheizprozess erfolgte in Schritten von 10 °C im Temperaturbereich von 25 °C bis 88 °C (a) Normalspektrum, (b) zweite Ableitung.

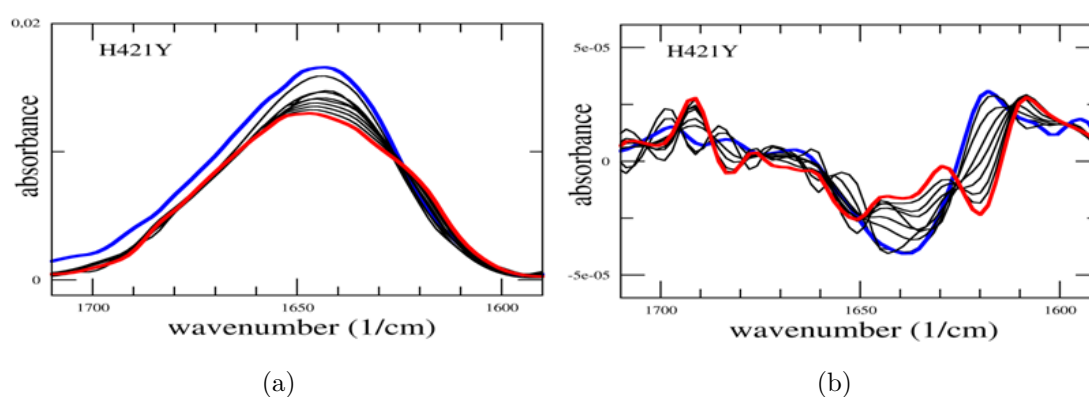


Abbildung 3.13: FT-IR-Spektrum Amid I Region von nativem (blau) und thermisch denaturiertem (rot) H421Y-Protein in Probenpuffer 10 mmol/L Tris/DCl in D₂O, 0, 1 mmol/L ZnCl₂, 0,1% (w/v) β -OG, pH 7,2, Konzentration der Probe (ASM-H421Y) 1 mg/mL, Probevolumen 10 μ L, Verwendung von CaF₂ Fenstern, der Aufheizprozess erfolgte in Schritten von 10 °C im Temperaturbereich von 25 °C bis 88 °C (a) Normalspektrum, (b) zweite Ableitung.

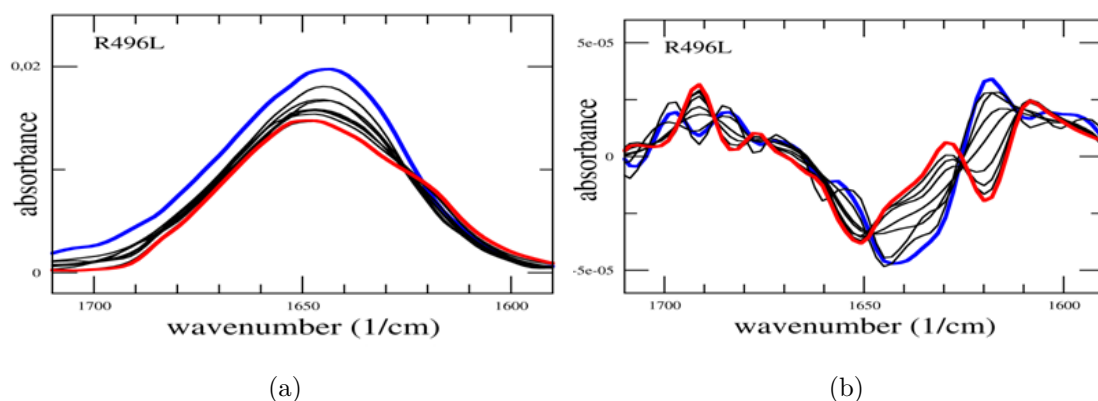


Abbildung 3.14: FT-IR-Spektrum Amid I Region von nativem (blau) und thermisch denaturiertem (rot) R496L-Protein in Probenpuffer 10 mmol/L Tris/DCl in D₂O, 0, 1 mmol/L ZnCl₂, 0,1% (w/v) β -OG, pH 7,2, Konzentration der Probe (ASM-R496L) 1 mg/mL, Probevolumen 10 μ L, Verwendung von CaF₂ Fenstern, der Aufheizprozess erfolgte in Schritten von 10 °C im Temperaturbereich von 25 °C bis 88 °C (a) Normalspektrum, (b) zweite Ableitung.

Bedauerlicherweise wiesen die Spektren der Varianten ASM-H421Y und ASM-R496L ein zu hohes Signal/ Rausch-Verhältnis auf und wurden daher für die weitere Auswertung nicht berücksichtigt. Die Spektren der Proteine WT-ASM und ASM-R289H konnten nach Bildung der zweiten Ableitung und anschließender SVD-Zerlegung (Singular Value Decomposition) für quantitative Aussagen hinsichtlich des Anteils einzelner Komponenten vorhandener Sekundärstrukturelemente verwendet werden (vergleiche Abb. A.11- Abb. A.14). Beide Proteine zeigten ein ähnliches Verhalten während des thermischen Denaturierungsprozesses. Die α -helikale Komponente (Bandenlage 1648 cm⁻¹ bzw. 1647 cm⁻¹) ist bei 88 °C nicht mehr zu identifizieren. Der Anteil des β -Faltblatts (1631 cm⁻¹/1630 cm⁻¹) nimmt mit ansteigender Temperatur ab, zudem verschiebt sich die Lage der Bande hin zu geringerer Wellenzahl (1620 cm⁻¹). Im Gegensatz dazu gewinnen die Turn-Bereiche an Intensität. Das Maximum der Bande verlagert sich ebenfalls zu geringerer Wellenzahl (1660 cm⁻¹ bzw. 1658 cm⁻¹). Strukturell ungeordnete Bereiche, die bei Raumtemperatur nicht auszumachen waren, treten neu hinzu (1638 cm⁻¹). Die Tabellen Tab. 3.2 und Tab. 3.3 fassen die Resultate zusammen.

Tabelle 3.2: Quantitative Bestimmung von Sekundärstrukturelementen des Proteins WT-ASM nach SVD-Zerlegung

	37 °C		88 °C	
Komponente	Bandenlage [cm ⁻¹]	Anteil [%]	Bandenlage [cm ⁻¹]	Anteil [%]
α -Helix	1648	47%	-	-
β -Faltblatt	1631	30%	1620	12%
Turn	1671	23%	1660	56%
ungeordneter Bereich	-	-	1638	32%

Tabelle 3.3: Quantitative Bestimmung von Sekundärstrukturelementen des Proteins ASM-R289H nach SVD-Zerlegung

	37 °C		88 °C	
Komponente	Bandenlage [cm ⁻¹]	Anteil [%]	Bandenlage [cm ⁻¹]	Anteil [%]
α -Helix	1647	67%	-	-
β -Faltblatt	1630	16%	1620	12%
Turn	1673	18%	1658	52%
ungeordneter Bereich	-	-	1638	36%

Anhand der gezeigten Daten lässt sich schlussfolgern, dass die Anteile der einzelnen Sekundärstrukturelemente im Wildtypenzym und in den varianten Formen bei Raumtemperatur in unterschiedlicher Ausprägung vorliegen. Möglicherweise besteht hier ein Zusammenhang zu den verschiedenen Restenzymaktivitäten, die bei den Patienten diagnostiziert werden. So liegt die α -helikale Komponente im Wildtypenzym weniger stark ausgeprägt vor (47%) als in der Variante ASM-R289H (67%). Der Anteil der β -Faltblattstruktur ist hingegen mit 30% etwa doppelt so groß, in Variante ASM-R289H beträgt er nur 16%. Die Turn-Bereiche sind in beiden Enzymen etwa gleich stark vertreten (WT-ASM: 23%, ASM-R289H: 18%). Am Ende des thermischen Denaturierungsprozesses sind die Anteile der Strukturkomponenten von Wildtypenzym und varianter Form R289H einander angeglichen.

Mit Hilfe der IR-Spektroskopie ist es prinzipiell möglich die Anteile einzelner Sekundärstrukturelemente zu bestimmen und dabei signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Sphingomyelinaseformen zu detektieren, die Abweichungen zwischen voneinander unabhängigen Einzelmessungen waren gering. Um auch für die Varianten ASM-H421Y und ASM-R496L verwertbare Spektren und damit aussagekräftige Analysedaten zu erhalten, sollten die Messungen mit noch weiter aufkonzentrierten Proben (z.B. 3 mg/mL statt bisher

1 mg/mL) wiederholt werden. Zusätzlich könnte die Kinetik des Denaturierungsvorgangs genauer verfolgt werden, wenn die Temperaturschritte während des Aufheizprozesses von 10 °C auf 5 °C gesenkt werden.

3.9 Oberflächenplasmonenresonanz-Experimente

Mit Hilfe der Oberflächenplasmonenresonanz (SPR) lässt sich die Interaktion zwischen Biomolekülen in Echtzeit untersuchen. Dabei wird einer der Interaktionspartner auf einer Sensorchip-Oberfläche immobilisiert und der andere mit einem kontinuierlichen Fluss über diese Oberfläche gespült. Somit lässt sich zum Beispiel die Interaktion eines membrangebundenen Proteins (immobilisierter Interaktionspartner) mit einem kleinen Molekül (z.B. ein Inhibitor) simulieren. Das Messprinzip beruht auf der Anregung eines Oberflächenplasmons (longitudinale Elektronenschwingung an einer dünnen Metalloberfläche) und damit einhergehender partieller Reflexion des eingestrahltten Lichtes von der Metalloberfläche. Die Intensität des reflektierten monochromatischen Lichtes wird in BIAcore-Geräten in Abhängigkeit des Winkels (SPR-Winkel) gemessen. Durch die Bindung von Molekülen an die Metalloberfläche kommt es zu einer Änderung des Brechungsindex, die zu einer Verschiebung des SPR-Winkels führt. Die Änderung des Brechungsindex oberhalb der Metalloberfläche hängt dabei linear mit der Anzahl der gebundenen Moleküle zusammen. Die beschriebene Änderung des SPR-Winkels wird anschließend umgerechnet und als Resonance unit (RU) dargestellt.

In der Literatur finden sich zahlreiche Beispiele, bei der diese Methode zur Gewinnung neuer Erkenntnisse über die Wirkungsweise der humanen sauren Sphingomyelinase beigetragen hat [131, 175]. Üblicherweise wurden Liposomen definierter Zusammensetzung auf einem Sensor Chip L1 immobilisiert und das Enzym anschließend daran gebunden.

Kürzlich wurde ein Zusammenspiel von HSP 70 und der humanen sauren Sphingomyelinase im Sphingolipid-Metabolismus bekannt [176]. Das heatshock Protein HSP 70, ein molekulares Chaperon, unterstützt die Faltung neu synthetisierter Proteine und fördert außerdem durch Stabilisierung der Lysosomen das Überleben von Zellen. Es verhindert das Absterben von Krebszellen durch Inhibition der Durchlässigkeit der lysosomalen Membran [177]. Werden Zellen bzw. Krebszellen mit rekombinantem HSP 70 versetzt, so gelangt es über Endocytose in die Lysosomen und tritt dort über seine ATPase-Domäne mit dem anionischen Phospholipid BMP in Wechselwirkung. Diese spezifische Interaktion trägt entscheidend zum Überleben der Zelle bei. Die HSP 70-BMP-Wechselwirkung verbessert bzw. erhöht die Bindung der sauren Sphingomyelinase an BMP, einem essentiellen Cofaktor des Sphingomyelin-Metabolismus. Daraus resultiert eine Stimulation der Aktivität der sauren

Sphingomyelinase und somit eine Stabilisierung des Lysosoms [176]. Das Wechselspiel von HSP 70, BMP und der sauren Sphingomyelinase eröffnet zudem eine neue Strategie in der Krebsbekämpfung, die als Membran-Lipid-Therapie bezeichnet wird [178].

Um mehr über die Wirkungsweise der sauren Sphingomyelinase zu erfahren, sind Inhibitoren dieses Enzyms ein nützliches Werkzeug und werden daher häufig genutzt. Ein sehr prominenter Inhibitor ist das kationische Amphiphil Desipramin, welches als Antidepressivum Anwendung findet. Desipramin liegt in den sauren Kompartimenten der Zelle protoniert vor und weist daher eine hohe Affinität zu den negativ geladenen Phospholipiden, wie z.B. BMP, auf. Damit geht eine störende Wirkung auf die Bindung der sauren Sphingomyelinase an die Lipiddoppelschichten einher, sodass die saure Sphingomyelinase vom Membran-gebundenen Substrat in den späten Endosomen und Lysosomen verdrängt wird. Das Enzym wird nun von den Proteasen dieser Zellkompartimente erkannt und abgebaut [131].

Siramesin zählt ebenfalls zur Kategorie der amphiphilen Amine und verursacht Phospholipidosis. Die basische Substanz reichert sich ähnlich dem Desipramin in den Lysosomen an und inhibiert dort die Aktivität verschiedener Hydrolasen, unter anderem die saure Sphingomyelinase und die saure Ceramidase. Desipramin und vermutlich auch Siramesin sind funktionelle Inhibitoren der sauren Sphingomyelinase (vergleiche Abbildung Abb. 3.17). Sie haben eine dem HSP 70 entgegengesetzte Wirkung auf die saure Sphingomyelinase. Als ein σ -2-Rezeptor-Agonist ist Siramesin außerdem in der Lage das Wachstum von Krebszellen zu inhibieren [179].

Die biomolekulare Analyse der Interaktion von Siramesin mit der sauren Sphingomyelinase, welche an BMP-haltigen Liposomen immobilisiert wurde, sollte Aufschluss darüber geben, inwieweit Siramesin als Inhibitor des Enzyms dazu geeignet ist, dieses von der inneren lysosomalen Membran zu entfernen und somit lysosomale Zelltodprogramme auszulösen. [180]. Die Messungen erfolgten im Rahmen eines Kooperationsprojekts mit der Arbeitsgruppe M. Jäättelä.

Die Herstellung der anionischen Liposomen erfolgte wie beschrieben nach [175] und [181] mit der Zusammensetzung 50 mol% PC, 20 mol% Chol, 20 mol% BMP, 10 mol% SM rehydratisiert in PBS-Puffer, Lipidendkonzentration 0,1 mM, Durchmesser 100 nm.

An die in einem Vorprogramm immobilisierten Liposomen wurde das Enzym WT-ASM gebunden (Inkubationszeit 3,5 min). Nach einer 5 minütigen Dissoziationsphase wurde der Effektor Siramesin für 30 sec injiziert. Während der anschließenden Dissoziationsphase (3 min) wurde in Abhängigkeit von der eingesetzten Siramesin-Konzentration ein mehr oder weniger starker Rückgang der Resonance units (RU) beobachtet, welcher den Ablöseprozess der WT-ASM anzeigt. Abschließend wurden die Liposomen mit Isopropanol/ 50 mM NaOH

(2: 3) von der Chipoberfläche entfernt. In Abbildung Abb. 3.15 ist das entsprechende Sensorgramm dargestellt.

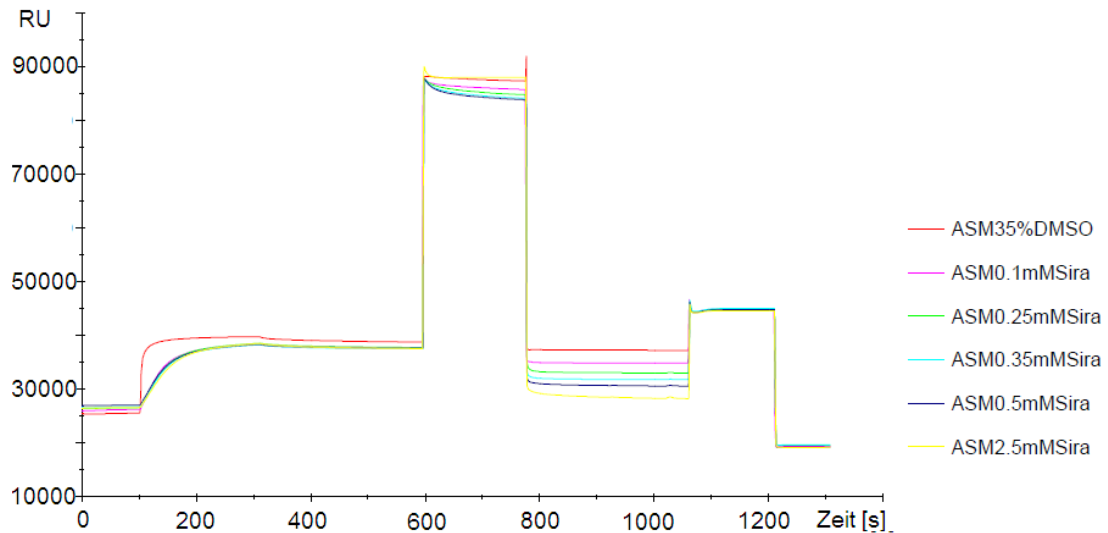


Abbildung 3.15: Interaktion von Siramesin mit an Liposomen immobilisierter WT-ASM (SPR-Messungen): Zusammensetzung der Liposomen 50 mol% PC, 20 mol% Chol, 20 mol% BMP, 10 mol% SM rehydratisiert in PBS-Puffer, Lipidendkonzentration 0,1 mM, ϕ 100 nm; Enzymkonzentration 50 μ g/mL, Puffer 100 mM Natriumacetat, pH 4,5; Konzentration Siramesin 0,1 – 2,5 mM in 35% DMSO/ 50 mM Natriumacetat; Sensor Chip L1
100 sec: Injektion WT-ASM, Inkubation bis 310 sec, Dissoziationsphase bis 610 sec,
610 sec: Injektion Siramesin, Dissoziationsphase bis 820 sec, Spülphase bis 1060 sec,
1060 sec: Injektion Isopropanol/ 50 mM NaOH, Dissoziationsphase bis 1210 sec, Spülphase bis 1300 sec.

Unter den beschriebenen Bedingungen bindet das Enzym WT-ASM an die immobilisierten Liposomen und dissoziiert kaum (Verbleib von 88% der WT-ASM an den Liposomen), wenn nachfolgend nur Effektorpuffer (35% DMSO/ 50 mM Natriumacetat) injiziert wird. Im Gegensatz dazu war bei der Injektion des Effektors Siramesin ein deutlicher Rückgang der Bindungssignale RU zu beobachten; eine zunehmende Konzentration an Siramesin ging dabei mit einer Reduktion des verbleibenden Teils des Enzyms an den Liposomen einher. Als Kontrolle dienten Messungen mit dem Effektor Desipramin (2,5 und 20 mM Desipramin in 35% DMSO/ 50 mM Natriumacetat). Auch in diesem Fall wurde ein Rückgang der Bindungssignale ausgelöst, allerdings wurden dafür deutlich höhere Konzentrationen an

Effektor benötigt. Die Potenz des Effektors Siramesin lag somit etwa um ein Zehnfaches über der des Effektors Desipramin. Die resultierende Abstufung ist Abbildung Abb. 3.16 zu entnehmen.

Parallel wurde die gesamte Versuchsreihe mit immobilisiertem rekombinantem HSP 70 in identischer Weise durchgeführt. Im genannten Konzentrationsbereich zeigte der Effektor Siramesin keinerlei Wirkung auf das Bindungsverhalten von HSP 70 an BMP-haltige Liposomen. Diese Beobachtung spricht für eine gewisse enzymatische Spezifität der beschriebenen Effekte. Offenbar wird nicht jede auftretende Interaktion eines Proteins mit BMP-haltigen Liposomen durch Siramesin nachweislich unterbunden.

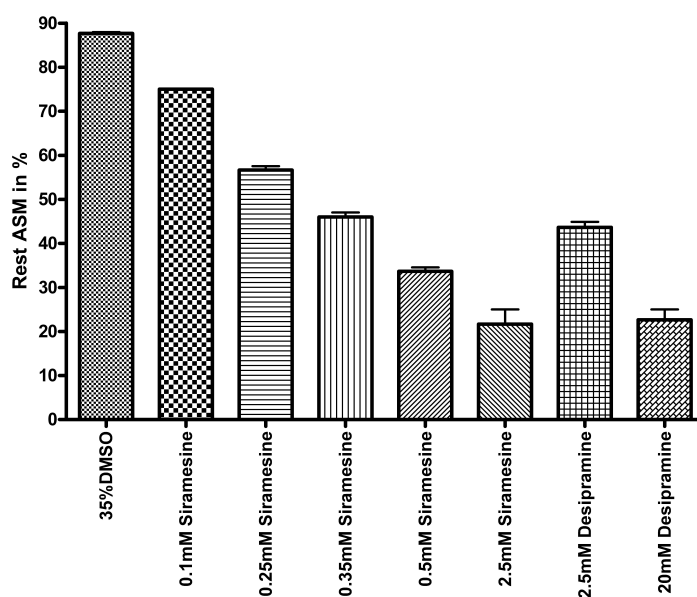


Abbildung 3.16: Interaktion von Siramesin und Desipramin mit an Liposomen immobilisierter WT-ASM (SPR-Messungen): Dissoziation des Enzyms WT-ASM in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration an Siramesin (0, 1 – 2, 5 mM) und Desipramin (2, 5 und 20 mM); die am Ende der Assoziationsphase erreichten RU werden auf 100% gebundene WT-ASM normiert, es ergibt sich folgende Abstufung an restlichem gebundenem Enzym: 0, 1 mM Siramesin 75%, 0, 25 mM Siramesin 57%, 0, 35 mM Siramesin 46%, 0, 5 mM Siramesin 34%, 2, 5 mM Siramesin 22%, 2, 5 mM Desipramin 44%, 20 mM Desipramin 23%.

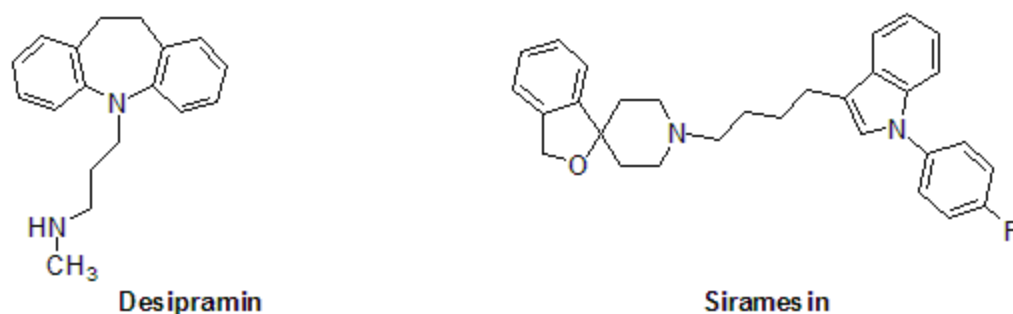


Abbildung 3.17: Struktur der Effektoren Desipramin und Siramesin

Die gezeigten Daten legen die Vermutung nahe, dass Siramesin in lebenden Zellen eine sehr effiziente Ablösung der sauren Sphingomyelinase von der inneren lysosomalen Membran bewirkt und daraus die Inhibition des Enzyms resultiert.

Weiterführende Studien lassen die Schlussfolgerung zu, dass es sich bei der humanen sauren Sphingomyelinase um ein wichtiges Zielprotein in der Krebstherapie handelt [180]. Durch die spezifische Inhibition der sauren Sphingomyelinase und der damit einhergehenden Destabilisierung des Lysosoms konnte das Absterben von Krebszellen herbeigeführt werden, die zuvor bereits Resistenzen gegenüber Apoptose und Chemotherapeutika aufwiesen. In diesem Zusammenhang zeigte Siramesin im Vergleich zu anderen klassischen Inhibitoren der sauren Sphingomyelinase (z.B. Desipramin) nicht nur eine außerordentlich hohe inhibitorische Wirksamkeit, sondern auch eine spezifisch gegen Krebszellen gerichtete Cytotoxizität. Zukünftig könnten Tumore mit einer geringen Sphingomyelinaseaktivität unter Ausnutzung der lysosomalen Zelltodprogramme oder auch in Kombination mit klassischen Chemotherapien behandelt werden.

4 Zusammenfassung

Die humane saure Sphingomyelinase (ASM) nimmt im Sphingolipid-Katabolismus eine zentrale Rolle ein. Dieses Zn^{2+} -abhängige Enzym, welches in zwei Isoformen (der lysosomalen und der sekretorischen Form) vorkommt, katalysiert den Abbau von Sphingomyelin zu Ceramid und Phosphorylcholin und setzt damit eine Reaktionskaskade bioaktiver Lipide in Gang. Insbesondere dem Ceramid kommt dabei eine besondere Bedeutung in der Signaltransduktion zu, da es an so wichtigen Prozessen wie der Zelldifferenzierung und -proliferation, aber auch an Apoptose beteiligt zu sein scheint. Ein enzymatischer Defekt der humanen sauren Sphingomyelinase führt zur Akkumulation von Sphingomyelin und resultiert in der lysosomalen Speicherkrankheit Niemann-Pick-Syndrom. Neueste Studien stellen auch einen Zusammenhang zwischen der sauren Sphingomyelinase und verschiedenen anderen Erkrankungen (u.a. Arteriosklerose, Mukoviszidose, Krebs) her. Bislang ist der vollständige Reaktionsmechanismus dieses bedeutenden Enzyms noch ungeklärt, ebenso wie das exakte strukturelle Aussehen und die Mechanismen, die die Regulation und Aktivierung des Enzyms betreffen. Um entsprechende Struktur/Funktions-Untersuchungen durchführen zu können, ist die Verfügbarkeit reiner Proteine in größeren Mengen eine wesentliche Voraussetzung.

Ziel der vorliegenden Arbeit war daher, sowohl das humane Wildtyp-Enzym (sekretorische Form der ASM) als auch ausgewählte Niemann-Pick-Varianten der sauren Sphingomyelinase zu exprimieren und anschließend ein geeignetes Reinigungsverfahren, welches auf alle genannten Proteine anwendbar ist, zu etablieren. Dies gelang durch Tangentialfluss-filtration und nachfolgende sequentielle Chromatographie an Concanavalin A Sepharose (Lektin-Affinitätschromatographie), Butyl-S-Sepharose (hydrophobe Interaktionschromatographie), Desalting Sephadex Medium (Desalting Chromatographie) und Mono Q Sepharose (Anionenaustauschchromatographie). Die erhaltenen Proteine konnten annähernd bis zur Homogenität gereinigt werden und wiesen untereinander einen vergleichbaren Reinheitsgrad auf. Der Reinigungserfolg der einzelnen Chromatographiestufen wurde mittels SDS-PAGE Analyse nachvollzogen, die Identität der Proteine wurde im Western Blot überprüft.

Darüber hinaus wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstmals versucht, die humane saure Sphingomyelinase über zellfreie Proteinexpression zu gewinnen. Dieses Unterfangen

scheiterte jedoch an der fehlenden Synthese der Disulfidbrücken im Protein, die für die Funktionalität des Enzyms unabdingbar sind.

Neben der Expression und Reinigung der sauren Sphingomyelinase und einiger repräsentativ ausgewählter Varianten lag ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit auf der enzymatischen Charakterisierung der erhaltenen Proteine. Dabei wurde festgestellt, dass alle Proteine enzymatische Aktivität besitzen. Die Restenzymaktivität der varianten Formen, ausgenommen Variante H421Y, fällt jedoch sowohl im mizellaren als auch im liposomalen Assaysystem deutlich zu hoch aus, um für sich genommen den Niemann-Pick-Krankheitsverlauf zu erklären. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass die *in vivo* Stabilität dieser Varianten herabgesetzt ist bzw. ihr Transport ins Lysosom nicht in ausreichendem Maße erfolgt.

Im Zuge von zellulären Experimenten mit humanen ASM-defizienten Fibroblastenzellen (NPA -/-) konnte gezeigt werden, dass die Gabe von gereinigten Sphingomyelinaseformen (WT, R289H, H421Y oder R496L) den Sphingolipid-Metabolismus stimuliert. Dabei konnte ein Rückgang der Menge des radiomarkierten Sphingomyelins in den Zellen von bis zu 34% (Gabe des Wildtypenzym) erzielt werden. Die Zugabe der varianten Sphingomyelinaseformen führten zu einem geringeren Rückgang der Sphingomyelinmenge, je nach Variante um 30% (R289H) bis 10% (R496L).

(NPA -/-) Fibroblasten, die zusätzlich mit dem Proteaseinhibitor Leupeptin behandelt wurden, zeigten je nach Variante einen nochmaligen Rückgang des Sphingomyelinanteils um 16- 8%. Dieser Befund stützt die These, dass ein proteolytischer Abbau der Sphingomyelinaseformen (z.B. in den Lysosomen) im Zusammenspiel mit einem gestörten intrazellulären Transport Ursache der Niemann-Pick-Erkrankung sein könnte.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit waren strukturelle Untersuchungen der exprimierten Proteine (WT-ASM und Varianten) mittels IR-Spektroskopie, um Aufschluss über die quantitativen Anteile einzelner Sekundärstrukturelemente (α -Helix, β -Faltblatt, Turns und ungeordnete Bereiche) zu erhalten. Zumindest für das Wildtyp-Enzym und die Variante R289H konnten Ergebnisse erzielt werden, demnach unterscheiden sich die Anteile einiger Komponenten bei Raumtemperatur (der α -helikale Anteil ist im WT mit ca. 47% vertreten, in der Variante ASM-R289H mit 67%; der Anteil der β -Faltblattstruktur beträgt im WT 30%, in der Variante ASM-R289H nur 16%). Die Turn-Bereiche hingegen sind in beiden Enzymen etwa gleich stark vertreten (WT-ASM: 23%, ASM-R289H: 18%). Die IR-Spektren der verbleibenden Varianten ASM-H421Y und ASM-R496L waren auf Grund des schlechten Signal/ Rausch-Verhältnisses nicht adäquat interpretierbar.

Im Rahmen eines Kooperationsprojektes mit der Arbeitsgruppe M. Jäättelä (Kopenhagen, Dänemark) erfolgten SPR-Messungen zur Untersuchung der biomolekularen Interaktion

des amphiphilen Amins Siramesin mit der sauren Sphingomyelinase. Ziel war die Klärung der Frage, inwieweit Siramesin als Inhibitor der sauren Sphingomyelinase geeignet ist, dieses Enzym von membranähnlichen Strukturen zu entfernen. Aufgrund des Vermögens, die an anionischen Liposomen immobilisierte saure Sphingomyelinase effizient von diesen abzulösen, liegt die Vermutung nahe, dass Siramesin diesen Ablöseprozess von der inneren lysosomalen Membran auch in lebenden Zellen bewirken kann. Der postulierte Mechanismus konnte somit untermauert werden. In der Studie wurde festgestellt, dass sich ein Absterben von Krebszellen induzieren ließ, die zuvor bereits Resistenzen gegenüber Apoptose und Chemotherapeutika gezeigt hatten, und somit das Tumorwachstum langsamer voranschritt. In diesem Zusammenhang wies Siramesin im Vergleich zu anderen klassischen Inhibitoren der sauren Sphingomyelinase (z.B. Desipramin) nicht nur eine außerordentlich hohe inhibitorische Wirksamkeit auf, sondern auch eine spezifisch gegen Krebszellen gerichtete Cytotoxizität.

In weiterführenden Studien wurde nachgewiesen, dass es sich bei der humanen sauren Sphingomyelinase um ein wichtiges Zielprotein in der Krebstherapie handelt, daher könnten zukünftig Tumore mit einer geringen Sphingomyelinaseaktivität möglicherweise unter Ausnutzung der lysosomalen Zelltodprogramme behandelt werden.

Zusätzlich zur sauren Sphingomyelinase wurden weitere wichtige Enzyme des Sphingolipid-Katabolismus exprimiert und zum Teil gereinigt. Die neutrale Sphingomyelinase wurde aus Kalbshirn und *E. coli* Rosetta, die saure Ceramidase ebenfalls aus Insektenzellen gewonnen. Beide Enzyme dienten zur Identifizierung neuer Inhibitoren, welche nun in zukünftigen Studien als nützliches Werkzeug verfügbar sind.

5 Ausblick

Seit ihrer Entdeckung vor etwa 50 Jahren sind auf dem Gebiet der Sphingomyelinasen bedeutende Fortschritte gemacht worden, es wurden insgesamt 5 verschiedene Formen identifiziert, eine dieser Formen, die saure Sphingomyelinase, wurde auch kloniert. In verschiedenen Krankheitsbildern wurden Zusammenhänge zwischen der sauren Sphingomyelinase und zellulären Prozessen beschrieben. Dennoch bleiben viele Fragen bestehen, die Grundlage für weitere Forschungsarbeiten sein könnten.

So stellt beispielsweise das Fehlen genauer Strukturinformationen für die saure Sphingomyelinase ein großes Problem dar. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zwar weitere Details zu den Sekundärstrukturelementen (quantitative IR-spektroskopische Bestimmung von α -helikalen Komponenten, β -Faltblatt- und Turn-Anteilen, sowie ungeordneter Bereiche) hinzugefügt, jedoch ergibt sich daraus auch unter Einbeziehung schon bekannter Sekundärstrukturelemente, wie dem Glykosylierungs- und Disulfidbrückenmuster, noch keine Gesamtstruktur. Wäre die Kristallstruktur des Enzyms bekannt, könnte möglicherweise der genaue Katalysemechanismus entschlüsselt werden. Dies könnte neue Erkenntnisse zu den molekularen Mechanismen der Regulation, sowie der Aktivierung und Deaktivierung der sauren Sphingomyelinase liefern. Eventuell ließen sich auch Unterscheidungskriterien zwischen der lysosomalen und der sekretorischen Form ableiten. Es ist auch vorstellbar, dass ein Vergleich der Kristallstrukturen von Wildtypenzym und Niemann-Pick-Varianten der sauren Sphingomyelinase neue Therapiemöglichkeiten für diese Sphingolipidspeicherkrankheit eröffnet. Bisherige Bemühungen, Kristalle der sauren Sphingomyelinase zu erhalten, waren erfolglos. Eine Ursache könnten die vielen verschiedenen nativen Glykoformen des Proteins nach der Expression und Reinigung sein, die nebeneinander vorliegend den Kristallisationsprozess erschweren. Möglicherweise führt die Erzeugung einer uniformen Glykosylierung (z.B. durch Reaktion mit Endo- β -N-acetylglucosaminidasen wie Endo M) unter Aufrechterhaltung der Faltung des Proteins hier zum Erfolg.

Ein weiteres Problem stellt die Tatsache dar, dass in vielen, auf zellulärer Ebene durchgeführten Studien über Ergebnisse berichtet wird, welche die saure Sphingomyelinase in allgemeiner Form betreffen, beispielsweise Änderungen der Topologie nach entsprechender Stimulation oder inhibitorische Effekte. Der Erkenntnisgewinn wäre um ein Vielfaches höher, könnte in diesen Studien zwischen der lysosomalen und der sekretorischen Form der sauren Sphingomyelinase differenziert werden. Die Entwicklung eines Assaysystems, das in der Lage ist, diese Unterscheidung zu realisieren, wäre für zukünftige Studien sehr hilfreich. Auch auf dem Gebiet der Signaltransduktion sind bislang viele Fragen offen geblieben: so fehlt es an Studien, die aufzeigen, in welchen Zellkompartimenten genau Ceramid gebildet wird und zu welchem Zweck. Auf diese Weise könnte man Einblicke in die Modulation des Ceramidspiegels in bestimmten Zell- oder Körperregionen erlangen, die mit bestimmten Erkrankungen in Zusammenhang stehen.

Des weiteren wäre die Klonierung und eingehende Charakterisierung der verbleibenden Sphingomyelinasen (neutrale Sphingomyelinase und alkaline Sphingomyelinase) sinnvoll, um so Fragestellungen hinsichtlich der Beteiligung der verschiedenen Sphingomyelinasen an konkreten Zellprozessen (z.B. Induktion der Apoptose) beantworten zu können und Erkenntnisse darüber zu erhalten, auf welche Sphingomyelin-Pools sie im Speziellen wirken. Die Familie der Sphingomyelinasen bleibt ein wichtiges Forschungsgebiet, da weitergehende Fragestellungen bezüglich ihrer Rolle in Signaltransduktionsprozessen und diversen Erkrankungen (unter anderem Niemann-Pick-Krankheit, Arteriosklerose, Mukoviszidose, Krebs) einer Antwort bedürfen.

6 Material und Methoden

6.1 Bezugsquellen

6.1.1 Geräte

Gerät	Typ, Hersteller	Sitz
Äkta FPLC	GE Healthcare	München
Äkta Pure	GE Healthcare	München
Analysenwaage	ATILON, ACCULAB	Göttingen
Autoklav	3150 ELV, Systec	Wettenberg
Blotapparatur	Mini-Transblot, BIORAD	München
Brutschrank	Incubat, MELAG	Berlin
Durchlichtmikroskop	hund WETZLAR	Wetzlar
Gelapparatur (Agarosegele)	MINI-SUB Cell GT, BIORAD	München
Gelapparatur (PAGE)	Mini-PROTEAN Tetra Cell, BIORAD	München
Geldokumentation	Kodak Image Station 4000MM Pro	Stuttgart
Gerätekühlschrank	Unichromat 1500, UNIEQUIP	Planegg
Glasgeräte	Schott	Mainz
Haushaltsmikrowelle	MWG 722, CLATRONIC	Kempen
Heissluftsterilisator	Ecocell, MMM-Group	München
Heizblock	HLC	Pforzheim
Inkubator	B15, Thermo SCIENTIFIC	München
CO ₂ Inkubator	SANYO	Wood Dale, USA
Liquidscintillation Analyzer	TRI-CARB 2800 TR, Canberra Packard	San Francisco, USA
Mehrkanalpipetten	BIOHIT	Rosbach
PCR Thermocycler	Tgradient, Biometra	Göttingen

Gerät	Typ, Hersteller	Sitz
pH Meter	Seven Easy, METTLER TOLEDO	Gießen
Pipetten	eppendorf	Hamburg
Pipettierhilfe	accupipex, eppendorf	Hamburg
Plattenlesegerät	POLARstar OPTIMA, BBMG LABTECH	Offenburg
Orbital-Schüttelinkubator	Certomat BS-1, satorius	Göttingen
Reinstwasseranlage	membraPure	Bodenheim
Sicherheitswerkbank	ESCO classII BSC, biomedis	Gießen
Spannungsquelle für Gelapparaturen	Power Pac HC, BIORAD	München
Spektrometer	SmartSpec, BioRad	München
Spektrophotometer	NanoDrop ND-1000	Wilmington, DE, USA
Taumelrollenmischer	neoLab	Heidelberg
Tischzentrifuge	eppendorf	Hamburg
Ultraschall-Generator	Cuphorn Sonifier 250 Branson	Danbury, USA
Ultrazentrifuge	Optima MAX, BECKMAN COULTER	München
VIVAFLOW 200	satorius stedim biotech	Göttingen
VIVAFLOW Pumpe	MASTERflex, LIS	Göttingen
Vortex Mixer	neoLab	Heidelberg
Wippbank	neoLab	Heidelberg
Zentrifuge	Megafuge 1.OR, Thermo SCIENTIFIC	München

6.1.2 Verbrauchsmaterial

Material	Hersteller/ Vertrieb	Sitz
Eppendorf-Reaktionsgefäße	STARLAB	Ahrensburg
Gel Saver II Tips	STARLAB	Ahrensburg
Pipettenspitzen	STARLAB	Ahrensburg
Reaktionsgefäße (Falcon Tubes)	neoLab	Heidelberg
Spritzenvorsatzfilter 0,2 µm	neoLab und VWR	Heidelberg
Szintillationsröhrchen	ROTH	Karlsruhe
Testplatten (für Assays)	nunc und Greiner	Nürtingen
Vollpipetten (steril)	TPP, BIOCHROM AG	Berlin
Zellkulturflaschen	TPP, BIOCHROM AG	Berlin
Zellkultur-Erlenmeyerkolben	Corning, SIGMA	Deisenhof
Zellkulturtestplatten	TPP, BIOCHROM AG	Berlin
Zellschaber	SARSTEDT	Nümbrecht
Zentrifugationsfilter	Amicon Ultra, MILLIPORE	Billerica, USA
Zentrifugenröhrchen (Ultrazentrifuge)	Opti Seal, BECKMAN COULTER	München

6.1.3 Chromatographiemedien und -säulen

Reagenz	Hersteller/ Vertrieb	Sitz
Butyl-S-Sepharose		
6 Fast Flow	GE Healthcare	München
ConA Sepharose 4B	GE Healthcare	München
HiTrap Desalting	GE Healthcare	München
5x 5 mL Säulen		
Mono Q 5/50GL Säule	GE Healthcare	München

6.1.4 Chemikalien

Substanz	Hersteller/ Vertrieb	Sitz
Ampicillin	ROTH	Karlsruhe
Ammoniumpersulfat	Amersham	Braunschweig
CaCl ₂	ROTH	Karlsruhe
Citronensäure	ROTH	Karlsruhe
Desipraminehydrochlorid	SIGMA	Deisenhof
Dexamethasone	ALEXIS Biochemicals	Lausen, Schweiz
DMSO	ROTH	Karlsruhe
Ethanol, absolut (unvergällt)	molecular biology grade, AppliChem	Darmstadt
Ethidiumbromid-Lösung	dropper bottle, AppliChem	Darmstadt
Gentamicin	SIGMA	Deisenhof
Glycin	ROTH	Karlsruhe
HMU-PC	MOSCERDAM SUBSTRATES	Dänemark
IPTG	ROTH	Karlsruhe
Kanamycin	SIGMA	Deisenhof
Methyl- α -D-mannopyranosid	Fluka	Deisenhof
MgCl ₂	ROTH	Karlsruhe
MnCl ₂	ROTH	Karlsruhe
NaCl	VWR	Darmstadt
Natriumcitrat	Tribasicdihydrat, ROTH	Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat	SIGMA	Deisenhof
Nonidet P40-Substitute	Fluka	Deisenhof
n-Octyl- β -D-glucopyranosid	ROTH	Karlsruhe
Tetracyclin	SIGMA	Deisenhof
Tris-(hydroxymethyl)- aminomethan	ROTH	Karlsruhe
X- β -Gal	ROTH	Karlsruhe
ZnCl ₂	SIGMA	Deisenhof

6.1.5 Puffer und Standardreagenzien

Reagenz	Hersteller/ Vertrieb	Sitz
Albumin fettsäurefrei (defatted BSA)	ROTH	Karlsruhe
BMP	Avanti Polar Lipids	Alabaster, USA
BODIPY-FLC12- sphingomyelin	Invitrogen	Carlsbad, CA, USA
Cellfectin Transfection Reagent	Invitrogen	Carlsbad, CA, USA
Coomassie Brilliant Blue G250	Fluka	Deisenhof
Cholesterol	Avanti Polar Lipids	Alabaster, USA
complete mini Protease- Inhibitorcocktail	Roche	Mannheim
FBS Superior	BIOCHROM AG	Berlin
G418 BC	BIOCHROM AG	Berlin
HEPES	BIOCHROM AG	Berlin
PBS-Tabletten	GIBCO, Invitrogen	Carlsbad, CA, USA
Penicillin/ Streptomycin	BIOCHROM AG	Berlin
Sample Buffer Laemmli (2x conc.)	SIGMA	Deisenhof
SeaKem LE Agarose	Biozym	Hessisch Oldendorf
Select Agar	Invitrogen	Carlsbad, CA, USA
Sphingomyelin	SIGMA	Deisenhof
(N-methyl- ¹⁴ C) Sphingo- myelin (bovine)	Amersham, GE Healthcare	München
TAE (50x)	AppliChem	Darmstadt
TEMED	Acros	Geel
Triton X-100	molecular biology grade, SIGMA	Deisenhof
Trypanblau	ROTH	Karlsruhe
Trypsin	BIOCHROM AG	Berlin

6.1.6 Enzyme und Kits

Reagenz	Hersteller/ Vertrieb	Sitz
Restriktionsendonucleasen	NEW ENGLAND BioLabs	Frankfurt
T4 DNA-Ligase	NEW ENGLAND BioLabs	Frankfurt
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase	FINNZYMES, NEW ENGLAND BioLabs	Frankfurt
Phusion Site-Directed Mutagenesis Kit	FINNZYMES, NEW ENGLAND BioLabs	Frankfurt
MinElute Reaction Cleanup Kit	QIAGEN	Hilden
QIAquick GelExtraction Kit	Qiagen	Hilden
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen	Hilden
QuantiPro BCA Assay Kit	SIGMA	Deisenhof
ProteoSilver SilverStain Kit	SIGMA	Deisenhof
Cellular DNA Fragmentation ELISA	Roche	Mannheim
Cell Proliferation Reagent WST	Roche	Mannheim
Western Breeze Chromogenic Immunodetection System (for detection of Goat Primary Antibodies)	Invitrogen	Carlsbad, CA, USA
DNA Längenstandard	NEW ENGLAND BioLabs	Frankfurt
Quick-Load 2-LOG Ladder		
Precision Plus Protein	BIORAD	München
DualXtra Standard		
Precision Plus Protein	BIORAD	München
WesternC Standard		

6.1.7 Standardmedien für Zellkultur

Reagenz	Hersteller/ Vertrieb	Sitz
Dulbecco's MEM (w Glucose, stable Glutamine, NaPyruvat)	BIOCHROM AG	Berlin
Sf 900II SFM serum free medium	GIBCO, Invitrogen	Carlsbad, CA, USA
Glutamax Medium	GIBCO, Invitrogen	Carlsbad, CA, USA
RPMI Medium	GIBCO, Invitrogen	Carlsbad, CA, USA
LB-Medium (Lennox)	ROTH	Karlsruhe

6.1.8 Plasmide und Antikörper

Plasmid/ Antikörper	Herkunft
pSV Sport-WT ASM	Arbeitsgruppe Prof. Sandhoff, Bonn
pFast Bac 1	Arbeitsgruppe Prof. Sandhoff, Bonn
pcDNA 5/TO	Arbeitsgruppe Prof. Levade, Frankreich
pET32a-nSMase2	Arbeitsgruppe Prof. Nikolova-Karakashian, Kentucky, USA
anti-ASM-Antikörper (Ziege)	Arbeitsgruppe Prof. Sandhoff, Bonn
anti-ASAH 1-Antikörper (Kaninchen)	Arbeitsgruppe Prof. Sandhoff, Bonn

6.2 DNA-basierte Methoden

6.2.1 Allgemeine Kultivierungsbedingungen für Bakterienstämme

In der vorliegenden Arbeit wurden vorrangig Klonierungen durchgeführt, die Plasmide lieferten, die für das Bac-to-Bac- Expressionssystem (vergleiche Abb. A.4) verwendet werden konnten. Die Kultivierung der reinen und der transformierten *E. coli* Stämme erfolgte in LB Medium ohne Zusatz von Antibiotika. Einzelkolonien wurden mit 2 – 5 mL LB Medium inokuliert und über Nacht bei 37 °C, 350 rpm inkubiert. Diese Vorkulturen dienten zur Inokulation von größeren Kulturen (10 – 50 mL) sowie zur Amplifikation von Plasmiden. Die Selektion von Transformanten wurde mit Antibiotika-haltigen LB-Agarplatten durchgeführt.

6.2.2 Klonierung der Expressionsvektoren für die humane saure Sphingomyelinase und Varianten

Klonierung des Plasmids pFastBac für die humane saure Sphingomyelinase WT

Für die Klonierung der cDNA der humanen sauren Sphingomyelinase (ASM) wurde als Ursprungsplasmid pSVSport-WT ASM verwendet, welches vom Arbeitskreis Sandhoff (Bonn) stammte. Die generelle Vorgehensweise zeigt Abbildung Abb. 6.1.

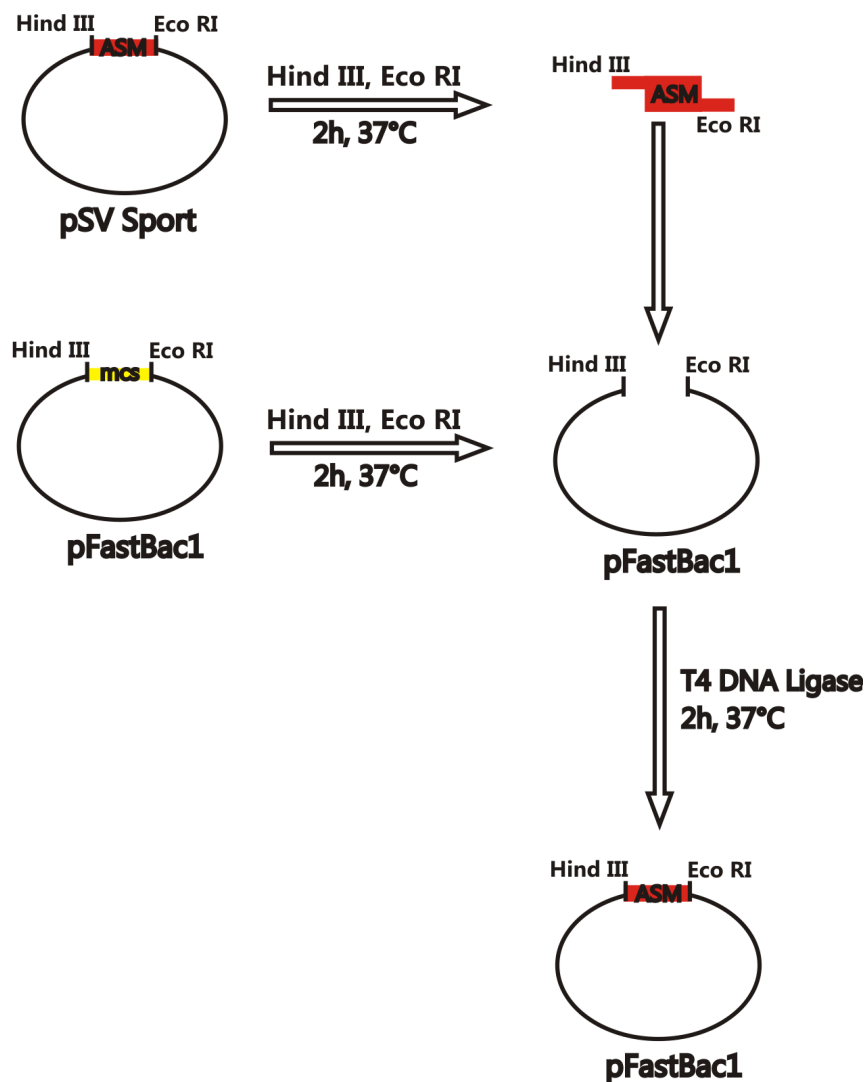


Abbildung 6.1: Erzeugung des Plasmids pFastBac-WTASM: schematische Darstellung, Größe der DNA-Fragmente: ASM 1800 bp, pSV Sport 3160 bp, pFastBac1 4775 bp.

Das Plasmid pSVSport-WT ASM wurde zunächst in den *E. coli* Stamm DH5 α transformiert. Die kompetenten *E. coli* DH5 α Zellen (200 μ L) wurden 30 min auf Eis aufgetaut und anschließend mit 1 μ L Plasmid-DNA versetzt. Der Ansatz wurde weitere 30 min auf Eis inkubiert und danach für 45 sec auf 42 °C erhitzt (heat shock). Bei dieser Prozedur zogen sich die Poren der kompetenten Zellen zusammen, sodass die Plasmid-DNA eingeschlossen wurde. Nach 2 minütigem Stehen auf Eis wurde zu dem Ansatz 500 μ L LB Medium gegeben und 45 min bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Entsprechende Aliquots des Transformationsansatzes wurden dann mit sterilen Glasperlen auf einer Ampicillin-Agarplatte verteilt und über Nacht bei 37 °C bebrütet. Von dieser Platte wurden Einzelkolonien gewonnen, mit 2 – 5 mL LB Medium inokuliert und über Nacht bei 37 °C, 350 rpm inkubiert. Die Transformation und Amplifikation des Plasmids pFastBac1, welches als neues Vektor-Rückgrat dienen sollte, erfolgte analog.

Anschließend konnte die so amplifizierte Plasmid-DNA aus den Bakterien mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit der Firma Qiagen isoliert werden. Die Methode beruht auf der alkalischen Lyse der Bakterienzellen und anschließender Adsorption der DNA an eine Silicamembran. Alle Arbeitsschritte wurden der Vorschrift entsprechend durchgeführt.

Im nächsten Schritt wurde die Plasmid-DNA einer sequenziellen enzymatischen Spaltung mit Restriktionsendonucleasen unterzogen. Im vorliegenden Fall wurden dazu die Enzyme Hind III und Eco RI verwendet, da diese die Ziel-DNA nur einmal schneiden und dabei zusätzlich die für die Ligation günstigen kohäsive Enden erzeugen.

Tabelle 6.1: Reaktionsansatz für die enzymatische Spaltung des Plasmids pSVSport-WT ASM bzw. pFastBac1 mit Hind III, Inkubation bei 37 °C, 2 Stunden; danach Hitzeinaktivierung 65 °C, 20 min.

	Menge
10x Puffer NEB 2	3 μ L
Wasser	6 μ L
Hind III	1 μ L
DNA Templat	20 μ L (5000 ng)

Tabelle 6.2: Reaktionsansatz für die enzymatische Spaltung des Plasmids pSVSport-WT ASM bzw. pFastBac1 mit Eco RI, Inkubation bei 37 °C, 2 Stunden

	Menge
NEB Puffer Eco RI	1 µL
Eco RI	1 µL
DNA (Reaktionsmischung des obigen Verdaus)	30 µL

Anschließend wurde der gesamte Reaktionsansatz auf ein 1% iges Agarosegel aufgetragen, die gewünschten DNA-Banden mittels Skalpell ausgeschnitten und mit dem QIAquick Gel Extraction Kit den Herstellerangaben entsprechend aufgereinigt. Die so erhaltenen DNA-Fragmente konnten direkt für die Ligationsreaktion eingesetzt werden.

Bei dieser durch die T4 DNA-Ligase katalysierten Reaktion wird eine Phosphodies-terbindung zwischen einer endständigen 5'Phosphatgruppe und einer 3'Hydroxylgruppe geknüpft, sodass eine doppelsträngige DNA entsteht. Die Wahl des molaren Konzentra-tionsverhältnisses von Insertionsfragment zu Plasmid ist für den erfolgreichen Verlauf der Reaktion von entscheidender Bedeutung, gewöhnlich ist ein 10facher Überschuss an Insert-DNA ausreichend.

Tabelle 6.3: Reaktionsansatz für die Ligation der DNA-Fragmente: Insert WT-ASM und Vektor pFastBac1, Inkubation bei 37 °C, 2 Stunden

	Menge
10x NEB T4 DNA Ligasepuffer	2 µL
Wasser	4 µL
T4 DNA Ligase	1 µL
Insert DNA	12 µL (210 ng)
Vektor DNA	1 µL (130 ng)

Das neu ligierte Plasmid (pFastBac-WTASM) musste wiederum in kompetente *E. coli* DH5α Zellen transformiert werden, dazu wurden die Zellen (200 µL) mit 20 µL des Ligationsansat-zes versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach dem Hitzeschock, der Ampicillin-Selektion auf Agarplatten, der Isolation einer Einzelkolonie und deren Vervielfältigung in LB Me-dium, konnte die DNA des Plasmids mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit aufgereinigt. Zur Kontrolle wurde die DNA nochmals der enzymatischen Reaktion mit Hind III und Eco RI unterzogen. Klone, die eine Insertgröße von 1800 bp aufwiesen, wurden mittels Sequenzierung auf ihre Richtigkeit überprüft.

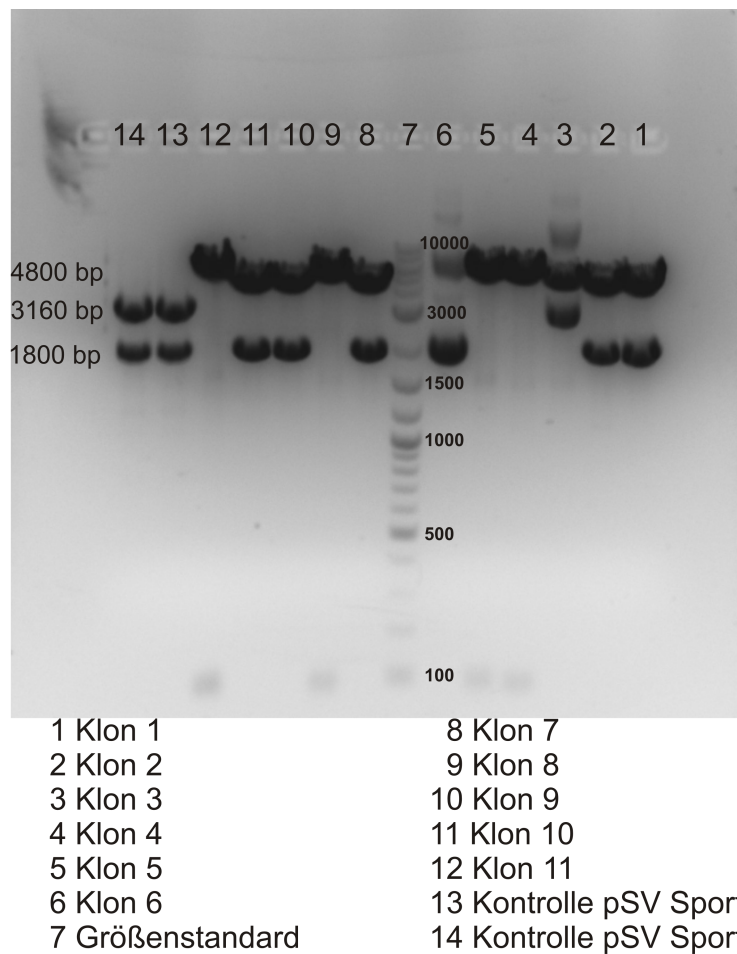


Abbildung 6.2: enzymatische Kontrollreaktion: Größe der DNA-Fragmente:
WT-ASM 1800 bp, pFastBac1 4775 bp, pSV Sport 3160 bp; weitere Arbeiten wurden mit den Klonen 1, 2, 7, 9 und 10 durchgeführt

Erzeugung des Bacmids Bac-WTASM für die humane saure Sphingomyelinase

Um vom Plasmid pFastBac-WTASM zum Bacmid Bac-WTASM zu gelangen, war eine erneute Transformation notwendig. Der spezielle Aufbau des *E. coli* Stamms DH10Bac ermöglicht die Durchführung dieser Reaktion. Die Transformationsreaktion erfolgte analog zum Transformationsprotokoll in *E. coli* DH5 α Zellen, allerdings war hier nach dem Hitzeschock eine Erhöhung der Inkubationszeit auf 3 Stunden erforderlich. Die Selektion wurde auf GKTXI-Agarplatten vorgenommen. Auf diesen Platten konnten die erfolgreich mit rekombinantem Plasmid transformierten Bakterien unter Ausnutzung des lacZ-Galactosidase-Systems durch Blau/Weiss-Selektion leicht identifiziert werden. Aus einer isolierten Einzelkolonie wurde

nach der Vervielfältigung in LB Medium die Bacmid-DNA mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit aufgereinigt und mittels PCR überprüft.

Klonierung der pFastBac-Plasmide für die Varianten der humanen sauren Sphingomyelinase

1. ortspezifische Mutagenese der pFastBac Plasmide

Primer, die für die ortsspezifische Mutagenese eingesetzt werden sollen, müssen am 5' Ende phosphoryliert sein. Da die gewünschte Mutation über eine fehlgepaarte Stelle des Primers in die Matrizen-DNA eingeführt wird, sollte diese möglichst mittig positioniert sein, um eine ausreichende Hybridisierung zu gewährleisten. Die Tabelle Tab. 6.4 zeigt die verwendeten Primer.

Tabelle 6.4: verwendete Primer für die ortsspezifische Mutagenese: Die Primer müssen am 5' Ende phosphoryliert sein.

Mutation	Sequenz	Schmelztemperatur	MW [D]
R289H	fw CACCAGACTCATCAGGACCAACT	66,5 °C	6946
R289H	rev CAGACATCATGTGCGGGGAT	68,3 °C	6182
H421Y	fw AGGAGACAAAGTGTATATAATTGGCCA	65,1 °C	8380
H421Y	rev CCTCGATCCTCAGCAGCCT	67,0 °C	5684
R496L	fw TAATCCTGGTTACCTTGTGTACC	60,5 °C	6980
R496L	rev AGGCCGATGTAGGTAGTTGCAC	66,1 °C	6815

Tabelle 6.5: Reaktionsansatz für die ortsspezifische Mutagenesereaktion

	Menge
Wasser	35 µL
5x Phusion HF Puffer	10 µL
d NTP Mix	1 µL
fw Primer	0,9 – 2,4 µL
rev Primer	0,9 – 2,0 µL
pFastBac-WTASM DNA	0,5 µL
Phusion Hot Start DNA Polymerase	0,5 µL

Die Einführung der Mutationen in die cDNA der humanen sauren Sphingomyelinase erfolgte wie im Phusion Site-Directed Mutagenesis Kit (FINNZYMES) beschrieben. Dazu wurden die Reaktionsansätze auf Eis in PCR-Tubes zusammen pipettiert. Die Reaktion wurde mit dem Programm mut.step im Thermocycler (T-Gradient Option) durchgeführt. Die enzymatische Reaktion für die Mutationen H421Y und R496L fand bei einer annealing-Temperatur von 60 °C (Reihe 5) statt, für die Mutation R289H wurde eine annealing-Temperatur von 63 °C (Reihe 10) gewählt.

Tabelle 6.6: Thermocyclerprogramm mut.step für die ortsspezifische Mutagenesereaktion

Schritt	Temperatur	Zeit	Schritt-Sprung	Wiederholung	Temperaturgradient
01	98 °C	30 sec	0	0	0
02	98 °C	15 sec	0	0	0
03	61 °C	30 sec	0	0	5 °C
04	72 °C	5 min	2	25	0
05	72 °C	5 min	0	0	0
06	4 °C	1440 min	0	0	0

2. Ligation und Transformation der pFastBac-Mutanten

Anschließend wurde das erhaltene PCR Produkt in einer Ligationsreaktion zirkularisiert. Dazu wurden 3 µL der jeweiligen PCR-Lösung mit 2 µL Wasser und 5 µL Ligationspuffer gemischt und anschließend mit 0,5 µL Quick T4 DNA Ligase versetzt. Nach einem Zentrifugationsschritt (15 sec, 10000rpm) wurde die Mischung 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und danach zum Abstoppen der Reaktion auf Eis gestellt.

Die zirkularisierten pFastBac-Mutanten (pFastBac-ASMR289H, pFastBac-ASMH421Y, pFastBac-ASMR496L) konnten nun in *E. coli* DH5α Zellen transformiert werden. Nach entsprechender Amplifikation wurde die Plasmid-DNA mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit aufgereinigt und mittels Sequenzierung auf das Vorhandensein der Mutation überprüft. Die anschließende Transformation der Plasmide in *E. coli* DH10Bac lieferte die entsprechende Bacmid-DNA, die mittels PCR überprüft wurde.

Erzeugung der Bacmide Bac-R289H-ASM, Bac-H421Y-ASM, Bac-R496L-ASM für die Varianten der humanen sauren Sphingomyelinase

Die Generierung der Bacmide für die varianten Formen der humanen sauren Sphingomyelinase erfolgte analog der für das Wildtyp-Bacmid beschriebenen Methode.

6.2.3 Klonierung des Expressionsvektors für die humane saure Ceramidase

Klonierung des Plasmids pFastBac für die humane saure Ceramidase

Für die Klonierung der cDNA der humanen sauren Ceramidase (ASAH) wurde als Ursprungsplasmid pcDNA 5/TO-ASAH1 verwendet, welches vom Arbeitskreis Thierry Levade (Frankreich) stammte. Das Vorgehen erfolgte analog zur Abbildung Abb. 6.1. Das Plasmid pcDNA 5/TO-ASAH1 wurde zunächst in den *E. coli* Stamm DH5 α transformiert. Die amplifizierte Plasmid-DNA wurde anschließend mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit der Firma Quiagen isoliert und mit den Restriktionsendonucleasen Bam HI und Xho I simultan enzymatisch gespalten. Die DNA wurde nachfolgend in einem 1% igem Agarosegel aufgetrennt, die Ziel-Bande (1187 bp) mittels Skalpell ausgeschnitten und mit dem QIAquick Gel Extraction Kit aufgereinigt. Mit dem Plasmids pFastBac1, welches auch hier als neues Vektor-Rückgrat benötigt wurde, wurde analog verfahren. Die so erhaltenen DNA-Fragmente konnten direkt für die Ligationsreaktion eingesetzt werden.

Tabelle 6.7: Reaktionsansatz für die enzymatische Spaltung des Plasmids pcDNA 5/TO-ASAH1 bzw. pFastBac1 mit Bam HI und Xho I Inkubation bei 37 °C, 2 Stunden

	Menge
10x Puffer NEB 3	10 μ L
Wasser	37 μ L
BSA (100x)	1 μ L
Bam HI	1 μ L
Xho I	1 μ L
DNA Templat	50 μ L (10 μ g)

Tabelle 6.8: Reaktionsansatz für die Ligation der DNA-Fragmente: Insert ASAH1 und Vektor pFastBac1, Inkubation bei 37 °C, 2 Stunden

	Menge
10x NEB T4 DNA Ligasepuffer	5 μ L
Wasser	23,5 μ L
T4 DNA Ligase	1 μ L
Insert DNA	20 μ L (210 ng)
Vektor DNA	0,5 μ L (130 ng)

Das ligierte Plasmid (pFastBac-ASAH) wurde in *E. coli* DH5 α Zellen transformiert, nach entsprechender Amplifikation wurde die Plasmid-DNA mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit aufgereinigt und zur Kontrolle nochmals der enzymatischen Reaktion mit Bam HI und Xho I unterzogen. Klone, die eine Insertgröße von 1187 bp aufwiesen, wurden mittels Sequenzierung auf ihre Richtigkeit überprüft.

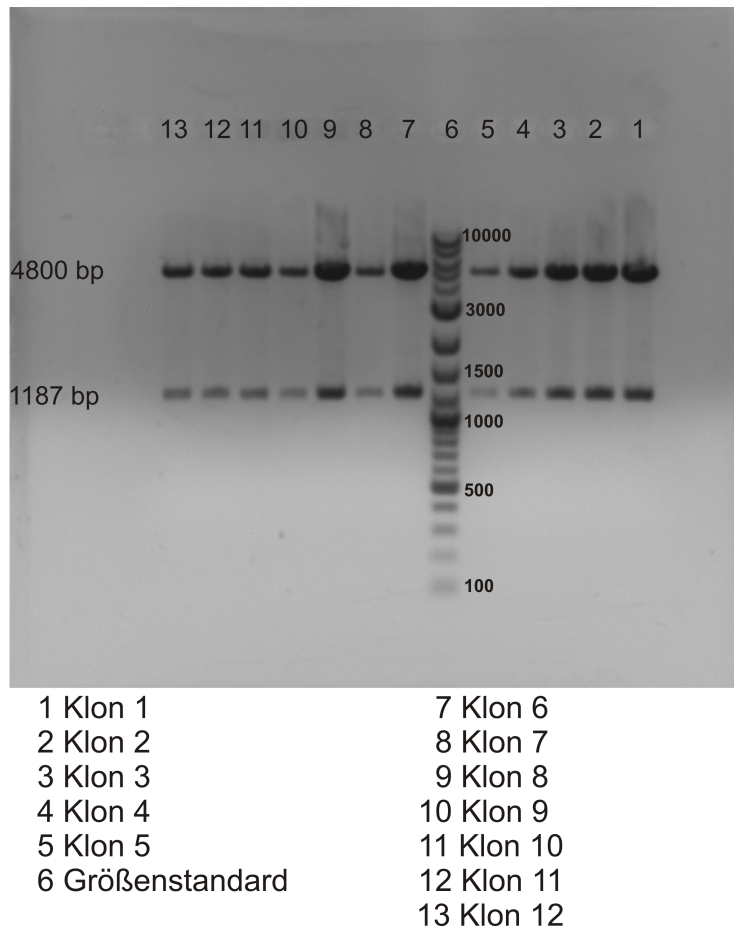


Abbildung 6.3: enzymatische Kontrollreaktion: Größe der DNA-Fragmente:
ASAH 1187 bp, pFastBac1 4775 bp; für die weiteren Arbeiten wurde Klon 3 verwendet

Erzeugung des Bacmids Bac-ASAH-1 für die humane saure Ceramidase

Durch Transformation des Plasmids pFastBac-ASAH in *E. coli* DH10Bac wurde die entsprechende Bacmid- DNA erhalten und mittels PCR überprüft.

6.3 Protein-basierte Methoden

6.3.1 Kultivierung von *Spodoptera frugiperda* 9 Insektenzellen

Die von der Firma Invitrogen bezogenen Zellen wurden den Angaben des Handbuchs Growth and Maintenance of Insect Cell Lines entsprechend kultiviert. Alle Arbeitsschritte erfolgten in einer sterilen Werkbank.

Zellen der Linie *Spodoptera frugiperda* 9 (*Sf*-9) wurden serumfrei in Suspensionskultur (27 °C, 90- 125rpm) bei einer Zelldichte von 2×10^6 Zellen/mL in sterilen Erlenmeyerkolben mit belüfteter Kappe kultiviert. Die Zellen konnten 4 Monate für Expressionsansätze verwendet werden, anschließend erfolgte der Austausch durch frisch aufgetaute Zellen einer niedrigeren Passage. Die Vitalität der Zellen und ihre Anzahl wurde täglich durch Trypan-Blau Färbung und anschließendes Auszählen in der Neubauer-Kammer bestimmt. Während der logarithmischen Wachstumsphase wurde die Zellzahl konstant zwischen 1×10^6 und 3×10^6 Zellen/mL gehalten. Die angegebenen Zellzahlen sollten zu keiner Zeit unter- bzw. überschritten werden, da anderenfalls der Übergang in nicht-logarithmisches Wachstumsverhalten droht und die Zellen anschließend schlechter infizierbar sind.

Auftauen und Einfrieren der Zelllinie

Zur Initiation der Zellkultur wurde ein Cryo-Röhrchen (enthält 1 mL Kulturlösung mit mindestens 20×10^6 Zellen/mL) aus dem Stickstoff-Dewar entnommen und in der Hand angetaut. Sobald sich das Zellpellet in dem Cryo-Röhrchen bewegen ließ, wurde es zügig in eine Zellkulturschale (wachstumsfördernd behandelt, 75 cm², mit belüfteter Kappe), die bereits 19 mL vorgewärmtes Insektenzellmedium (*Sf*-900 II SFM, Gibco) enthielt, überführt. Dann wurde die Schale in den Brutschrank gestellt und dort 30 bis 45 min bei 27 °C zum Absitzen der Zellen belassen. Anschließend wurde die gesamte Flüssigkeit vorsichtig aus der Schale gesaugt und durch 20 mL frisches, ebenfalls vorgewärmtes Medium ersetzt. Die Schale wurde über Nacht bei 27 °C inkubiert. Danach wurde der Zellrasen mit einem Zellschaber von der Oberfläche der Kulturschale abgelöst, die Lösung mit einer sterilen Pipette sanft homogenisiert und in einen sterilen 120 mL Erlenmeyerkolben überführt. Aufgrund des geringen Volumens in dem Erlenmeyerkolben, erfolgte die Inkubation zu Beginn der Suspensionskultur jeweils nur bei einer Geschwindigkeit von 75rpm. Mit zunehmendem Volumen konnte die Geschwindigkeit entsprechend erhöht werden. Die logarithmische Wachstumsphase setzte erfahrungsgemäß nach etwa 7 Tagen ein.

Sobald sich die Zellen stabil in der logarithmischen Wachstumsphase befanden, konnten sie zu Lagerzwecken wieder eingefroren werden. Dazu wurde ein genügend großes Kultur-

volumen in sterile 50 mL Falcon-Zentrifugationsröhrchen überführt und bei 500g, 10 min, Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet zügig in eisgekühltem Freezing Medium (60% Sf-900 II SFM Medium, 30% FCS, 10% DMSO) resuspendiert. Das Volumen an Freezing Medium wurde dabei so gewählt, dass sich die Gesamtzellzahl zwischen 20×10^6 und 80×10^6 Zellen/mL bewegte. Die Suspension wurde auf Cryo-Röhrchen verteilt (ca. 900 μ L Suspension pro Röhrchen). Die Röhrchen wurden anschließend in den Freezing-Behälter überführt und dieser zunächst eine Stunde bei -20°C , danach über Nacht bei -80°C stehen gelassen. Die Lagerung der Zellen erfolgte in flüssigem Stickstoff in dem dafür vorgesehenen Dewar.

Erzeugung der Baculoviren und Amplifikation

Die für die Expression erforderlichen Bacmid-Konstrukte (Bac-WT-ASM, Bac-R289H-ASM, Bac-H421Y-ASM, Bac-R496L-ASM und Bac-ASAH-1) wurden wie bereits beschrieben aus *E. coli* DH10Bac isoliert.

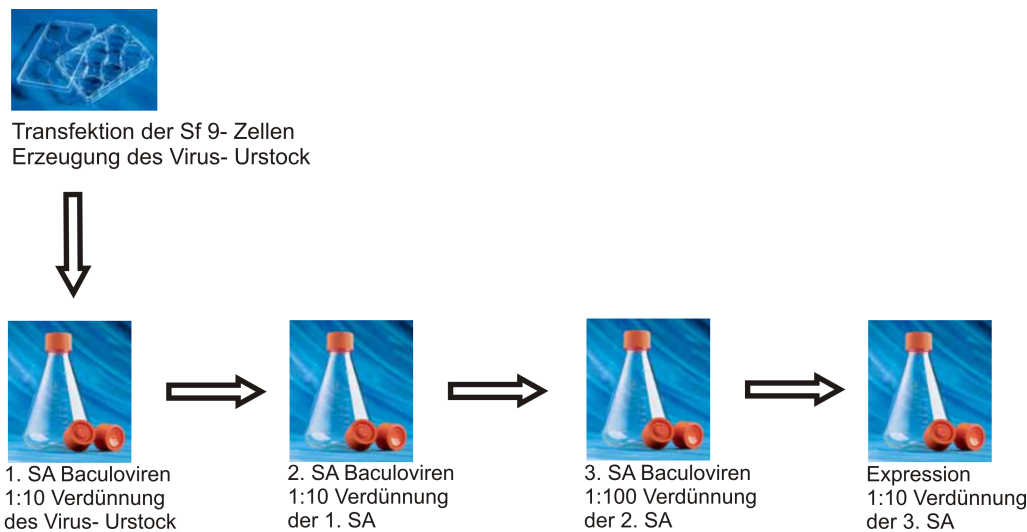


Abbildung 6.4: Erhalt und Amplifikation der Baculoviren:

Erzeugung des Virus-Urstocks, sowie der ersten bis dritten Schüttelamplifikationen (SA)

Für die Transfektion wurden *Sf9* Zellen, die sich in der logarithmischen Wachstumsphase befanden ($1,4 \times 10^6$ Zellen/mL), in einer six-well-Kulturschale ausgesät (500.000 Zellen pro Vertiefung in 2 mL Gesamtvolumen) und eine Stunde bei 27°C absitzen gelassen. In einem Eppendorfreaktionsgefäß wurde die Bacmid-DNA (1 - 2 μ g pro Vertiefung) mit 100 μ L Insektenzellmedium verdünnt und mit einer Reaktionsmischung bestehend aus 100 μ L

Medium und 6 μL Cellfectin (pro Vertiefung) 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Transfektionsmischung wurde anschließend mit 800 μL Medium (pro Vertiefung) versetzt und auf die Zellen in der Kulturschale gegeben, von denen zuvor das Medium entfernt worden war. Nach 16 stündiger Inkubation bei 27 °C wurde die Transfektionsmischung abgesaugt und den Zellen frisches, vorgewärmtes Medium zugeführt. Die weitere Inkubation erfolgte 72 Stunden bei 27 °C unter Lichtausschluss. Die Abbildung Abb. 6.4 verdeutlicht die Vorgehensweise schematisch.

Nach Ablauf der 72 stündigen Inkubationszeit, wurde die Lösung wurde aus der six-well-Kulturschale in 2 mL Falcon-Zentrifugationsröhrchen überführt und 15 min bei 4 °C, 3500g zentrifugiert. Der Überstand, den man als Virus-Urstock bezeichnet, wurde mit 200 μL FCS versetzt und im Kühlschrank unter Lichtausschluss aufbewahrt. Für die Proteinexpression mussten die Baculoviren zunächst in entsprechenden Kulturen amplifiziert werden:

- erste Schüttelamplifikation

2 mL Virus-Urstock und 20 mL *Sf9* Zellen wurden in einen sterilen Erlenmeyerkolben gegeben und 120 Stunden bei 27 °C, 75 rpm inkubiert; dem abzentrifugierten Überstand (15 min, 4 °C, 3500g) wurden 2 mL FCS zugefügt, die Lagerung erfolgte unter Lichtausschluss bei 4 °C.

- zweite Schüttelamplifikation

3 mL der ersten Schüttelamplifikation wurden mit 27 mL *Sf9* Zellen 72 Stunden bei 27 °C, 75rpm inkubiert; dem abzentrifugierten Überstand (15 min, 4 °C, 3500g) wurden 3 mL FCS zugefügt, die Lagerung erfolgte unter Lichtausschluss bei 4 °C.

- dritte Schüttelamplifikation

0,5 mL der zweiten Schüttelamplifikation wurden mit 50 mL *Sf9* Zellen 72 Stunden bei 27 °C, 90rpm inkubiert; dem abzentrifugierten Überstand (15 min, 4 °C, 3500g) wurden 5 mL FCS zugefügt, die Lagerung erfolgte unter Lichtausschluss bei 4 °C.

6.3.2 Expression und Reinigung der humanen sauren Sphingomyelinase

Alle Arbeitsschritte wurden nach den in der Arbeitsgruppe Sandhoff entwickelten Protokollen [168] durchgeführt und teilweise optimiert.

Expression

Für die Expression wurden Viren der dritten Schüttelamplifikation des entsprechenden Baculovirus verwendet. Diese wurden als 1:100 Verdünnung aus der zweiten Schüttelamplifikation des jeweiligen Virus erhalten. Die Infektion der Zellen erfolgte bei einer Dichte von $2,3 \times 10^6$ Zellen/mL, es wurde 5 Tage bei 27 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (4300g, 15 min, 4 °C), der virushaltige Überstand abgenommen, mit 10% (w/v) FCS versetzt und lichtgeschützt bei 4 °C gelagert. Durch Infektion der Zellen (Zelldichte $2,3 \times 10^6$ /mL) mit entsprechender Viruslösung (1:10 Verdünnung der 3. Schüttelamplifikation der Baculoviren) wurde die Expression initiiert. Dabei war zu beachten, dass die Kolben maximal bis zur Hälfte ihres Fassungsvermögens befüllt werden konnten, da anderenfalls die für die Expression notwendige Belüftung nicht in ausreichendem Maße gewährleistet war. Die Inkubationszeit betrug 96 Stunden (27 °C, 125rpm). Danach wurden die Zellen durch Zentrifugation (4300g, 20 min, 4 °C) abgetrennt und der proteinhaltige Überstand für die sich anschließenden Reinigungsschritte auf Eis gestellt.

Reinigung

Alle chromatographischen Reinigungsschritte wurden am FPLC-System der Firma Amersham bei einer Temperatur von 4 °C durchgeführt. Der Verlauf der Chromatographie konnte durch Messung der Leitfähigkeit und Absorption bei 280 nm verfolgt werden.

Die Abbildung Abb. 6.5 zeigt die einzelnen Stufen des Reinigungsprozesses schematisch.

1. Tangentialflussfiltration

Mit Hilfe des Tangentialflussfiltersystems Vivaflow 200 (Ausschlussgröße 30kDa) wurde der Expressionsüberstand unter Eiskühlung schrittweise eingeengt und mit Concanavalin A-Waschpuffer (Con A Waschpuffer) versetzt. Der Austausch des Mediums erfolgte durch Zugabe des 1.5 fachen Volumens an Puffer nahezu vollständig.

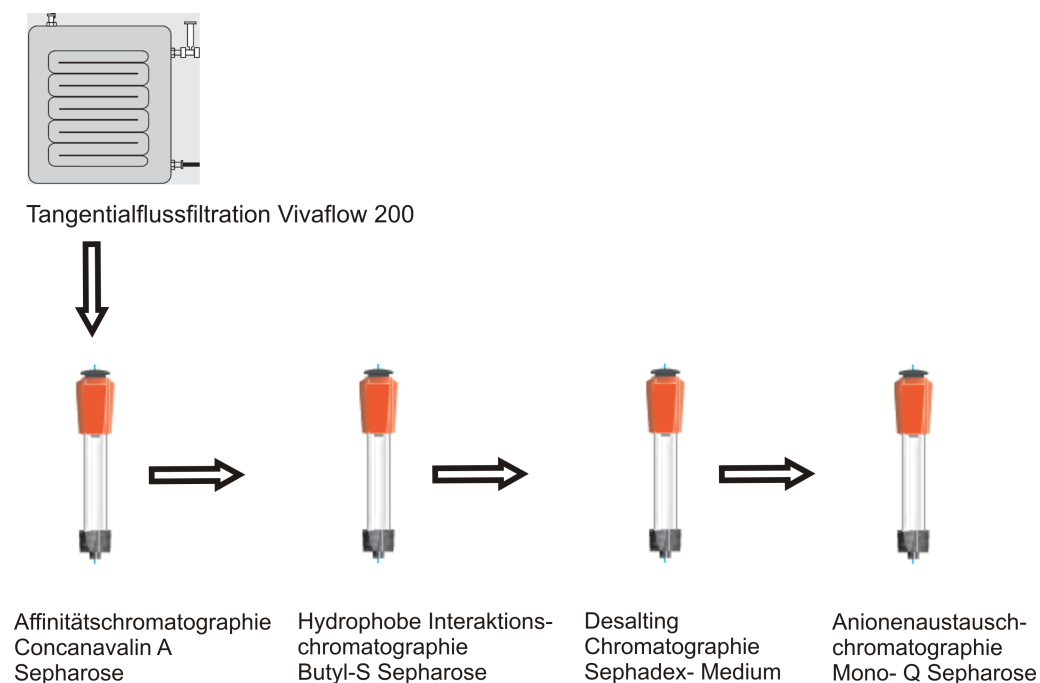


Abbildung 6.5: Darstellung der Reinigungsschritte in ihrer zeitlichen Abfolge: Tangentialflussfiltration, Affinitätschromatographie, Hydrophobe Interaktionschromatographie, Desalting Chromatographie, Anionenaustauschchromatographie

2. Affinitätschromatographie an Concanavalin A Sepharose

Alle Puffer wurden vor Gebrauch steril filtriert und bei 4 °C gelagert.

Tabelle 6.9: Puffer für die Concanavalin A Sepharose Chromatographie

Puffer	Zusammensetzung
ConA Waschpuffer ASM	30 mmol/L Tris/HCl, 0,5 mol/L NaCl, 0,1 mmol/L ZnCl ₂ , 1 mmol/L CaCl ₂ , 1 mmol/L MgCl ₂ , 1 mmol/L MnCl ₂ , 0,2% (w/v) β -OG, pH 7,2
ConA Elutionspuffer	30 mmol/L Tris/HCl, 0,5 mol/L NaCl, 0,1 mmol/L ZnCl ₂ , 1 mmol/L CaCl ₂ , 1 mmol/L MgCl ₂ , 1 mmol/L MnCl ₂ , 0,2% (w/v) β -OG, 20% (w/v) Methyl- α -D-mannopyranosid, pH 7,2

Die mit Concanavalin A Sepharose gefüllte Säule (18 mL CV) wurde mit 90 mL Con A Waschpuffer (Flussrate 1,5 mL/min) äquilibriert. Anschließend wurde das Retenat der

Tangentialflussfiltration mit einer Flussrate von 1,0 mL/min auf die Säule aufgetragen. Durch Waschen mit 150 - 180 mL Con A Waschpuffer (Flussrate 1,5 mL/min) konnten unspezifisch gebundene Proteine entfernt werden. Dieser Prozess galt als vollständig abgeschlossen, wenn Leitfähigkeit und UV-Spur einen konstanten Wert erreicht hatten. Die Elution der gebundenen Glykoproteine erfolgte in reverser Flussrichtung mit einem Stufengradienten von Con A Waschpuffer zu Con A Elutionspuffer (Gradient: 0 min bis 100% B Elutionspuffer, Flussrate 1,5 mL/min, Fraktionsgröße 5 mL). Es wurde mit 150 - 200 mL Puffer nacheluiert, bis die UV-Spur konstant blieb. Die Aktivität der einzelnen Fraktionen konnte im MOSCERDAM Assay getestet werden. Die Fraktionen mit hohen Aktivitäten wurden vereinigt. Die Abbildung Abb. A.5 zeigt ein typisches Chromatogramm. Nach Beendigung des Laufs wurde die Säule zunächst gründlich mit Wasser (millipore) gespült, bevor mit 90 mL Con A Regenerationspuffer (Con A Waschpuffer mit 1 mol/L NaCl, Flussrate 1,5 mL/min) in umgekehrter Flussrichtung regeneriert wurde. Abschließend wurde die Säule auf 100% Con A Waschpuffer zurück gespült.

3. Hydrophobe Interaktionschromatographie an Butyl-S Sepharose

Alle Puffer wurden vor Gebrauch steril filtriert und bei 4 °C gelagert.

Tabelle 6.10: Puffer für die Butyl-S Sepharose Chromatographie

Puffer	Zusammensetzung
Butyl-S Waschpuffer	30 mmol/L Tris/HCl, 2 mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,1 mmol/L ZnCl_2 , pH 7,2
Butyl-S Elutionspuffer	30 mmol/L Tris/HCl, 2 mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,1 mmol/L ZnCl_2 , 1% (w/v) β -OG, pH 7,2

Vor Beginn der Interaktionschromatographie musste das Eluat der Concanavalin A Chromatographie den hydrophoben Bedingungen angepasst werden. Das Eluat wurde in Zentrifugationsfilter (Amicon Ultra 15, 30.000 MWCO) überführt und bei 4300g, 4 °C portionsweise unter für jeweils 15 min zentrifugiert. Die Filter konnten dabei mehrfach wieder verwendet werden. Das erhaltene Konzentrat wurde dann mit dem 0,5 fachen Volumen einer 5 mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung versetzt.

Die mit Butyl-S Sepharose befüllte Säule (15 mL CV) wurde mit 50 mL Butyl-S Waschpuffer (Flussrate 1,5 mL/min) äquilibriert, anschließend mit dem Konzentrat beladen (Flussrate 1,5 mL/min) und danach mit 50 mL BS Waschpuffer (Flussrate 1,5 mL/min) gewaschen, bis die Leitfähigkeit wieder ihren ursprünglichen Wert erreicht hatte. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte in normaler Flussrichtung mit einem linearen Gradienten von

0 - 1% (w/v) β Octylglucopyranosid (Gradient: 15 min bis 100% B Elutionspuffer, Flussrate 1,5 mL/min, Fraktionsgröße 3 mL). Es wurde mit 50 mL BS Elutionspuffer (Flussrate 1,5 mL/min) nacheluiert. Die zu vereinenden Fraktionen wurden anhand ihrer Aktivität im MOSCERDAM Assay ermittelt. Die Abbildung Abb. A.6 zeigt ein typisches Chromatogramm.

Das erhaltene Eluat wurde in Zentrifugationsfilter (Amicon Ultra 15, 30.000 MWCO) überführt und bei 4300g, 4°C portionsweise für jeweils 15 min zentrifugiert. Das Gesamtvolumen des Konzentrats sollte sich dabei zwischen 1 und 2 mL bewegen.

Die Säule wurde im Anschluss mit 75 mL BS Regenerationspuffer (BS Waschpuffer ohne $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) mit einer Flussrate von 1,5 mL/min in reverser Flussrichtung regeneriert.

4. Umpuffern mit Sephadex Medium (Desalting)

Der Puffer wurde vor Gebrauch steril filtriert und bei 4°C gelagert.

Tabelle 6.11: Puffer für die Desalting Chromatographie

Puffer	Zusammensetzung
Desaltingpuffer	50 mmol/L Tris/HCl, 0,1 mmol/L ZnCl_2 , 0,4% (w/v) β -OG, pH 7,6

Je nach Volumen des Konzentrats wurden für die Desalting Chromatographie ein oder zwei HiPrep Desalting Säulen (5 mL CV pro Säule) an das FPLC System angeschlossen und mit 25 mL bzw. 50 mL (5 CV) Desalting Puffer äquilibriert (Flussrate 2,0 mL/min). Anschließend wurde das zuvor konzentrierte BS-Eluat auf die Säule geladen (Flussrate 0,5 mL/min). Dabei war zu beachten, dass das Probevolumen 1 mL bei Verwendung einer Säule bzw. 2 mL bei Verwendung von 2 Säulen nicht überschreiten durfte. Es wurde mit 15 CV Desalting Puffer (75 - 150 mL, Flussrate 2,0 mL/min, Fraktionsgröße 3 mL) nacheluiert, bis das Protein die Säule vollständig verlassen hatte. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden mittels UV-Spur identifiziert und vereinigt. Die Abbildung Abb. A.7 zeigt ein typisches Chromatogramm.

Die Säulen wurden mit weiteren 10 CV Desaltingpuffer (50 - 100 mL, Flussrate 2,0 mL/min) in umgekehrter Flussrichtung nachgewaschen.

5. Anionenaustauschchromatographie an Mono Q Sepharose

Alle Puffer wurden vor Gebrauch steril filtriert und bei 4 °C gelagert.

Tabelle 6.12: Puffer für die Mono Q Sepharose Chromatographie

Puffer	Zusammensetzung
Mono Q Waschpuffer	50 mmol/L Tris/HCl, 0,1 mmol/L ZnCl ₂ , 0,4% (w/v) β -OG, pH 7,6
Mono Q Elutionspuffer	50 mmol/L Tris/HCl, 1 mol/L NaCl, 0,1 mmol/L ZnCl ₂ , 0,4% (w/v) β -OG, pH 7,6
QL Lagerpuffer	10 mmol/L Tris/HCl, 0,1 mmol/L ZnCl ₂ , 0,1% (w/v) β -OG, pH 7,2

Eine mit Mono Q Sepharose befüllte Säule (1 mL CV) wurde mit 15 mL Mono Q Waschpuffer (Flussrate 1,0 mL/min) äquilibriert und danach mit dem Eluat der Desalting Chromatographie beladen (Flussrate 1,0 mL/min). Anschließend wurde mit 10 mL Mono Q Waschpuffer (Flussrate 1,0 mL/min) gewaschen. Die Elution erfolgte in normaler Flussrichtung mit einem linearen Gradienten von 0 - 1 mol/L NaCl (Gradient: 5 min bis 100% B, Flussrate 1,0 mL/min, Fraktionsgröße 0,5 mL). Es wurde mit 25 mL Mono Q Elutionspuffer (Flussrate 1,0 mL/min) nacheluiert. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden über die UV-Spur ermittelt und ihre Aktivität im MOSCERDAM Assay bestimmt. Die Fraktionen mit den höchsten Aktivitäten wurden vereint. Die Abbildung Abb. A.8 zeigt ein typisches Chromatogramm.

Die Säule wurde mit 25 mL Mono Q Waschpuffer (Flussrate 1,0 mL/min) in umgekehrter Flussrichtung regeneriert.

Das erhaltene Eluat konnte für die weitere Verwendung mit Zentrifugationsfilter (Amicon Ultra 2 oder Amicon Ultra 0,5, 30.000 MWCO) umgepuffert und aufkonzentriert werden, sofern dies erforderlich war. Die Lagerung erfolgte in flüssigem N₂.

6.3.3 Expression und Reinigung der humanen sauren Ceramidase

Alle Arbeiten wurden entsprechend den von Dr. Heike Schulze [170] entwickelten Protokollen durchgeführt.

Expression

Für die Expression wurden anfangs Baculoviren der Charge haCerP7 19.62.03 verwendet, die vom Arbeitskreis Sandhoff stammen. Zu einem späteren Zeitpunkt wurden selbst generierte Baculoviren eingesetzt.

Die Infektion der Zellen erfolgte bei einer Dichte von $2,3 \times 10^6$ Zellen/mL mit 15 mL Viruslösung. Es wurde 5 Tage bei 27 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (4300g, 15 min, Raumtemperatur) und der proteinhaltige Überstand unter sterilen Bedingungen mit 10% Essigsäure versetzt bis ein pH Wert von 4,2- 4,3 eingestellt war (ca. 5 mL Essigsäure auf 450 mL Kulturvolumen). Die Lösung wurde weitere 5 Tage bei 37 °C inkubiert, um eine Reifung der Ceramidase zu erzielen. Danach wurde die Lösung noch einmal bei 4300g 10 min zentrifugiert (Raumtemperatur) und der Überstand für die sich anschließenden Reinigungsschritte auf Eis gestellt.

Reinigung

Für den chromatographischen Reinigungsschritt wurde das FPLC-System der Firma Amersham verwendet. Der Verlauf der Chromatographie konnte durch Messung der Leitfähigkeit und Absorption bei 280 nm verfolgt werden.

1. Tangentialflussfiltration

Mit Hilfe des Tangentialflussfiltersystems Vivaflow 200 (Ausschlussgröße 30kDa) wurde der Expressionsüberstand unter Eiskühlung schrittweise eingeengt und mit ConA-Waschpuffer versetzt. Der Austausch des Mediums erfolgte durch Zugabe des 1.5 fachen Volumens an Puffer nahezu vollständig.

2. Affinitätschromatographie an Concanavalin A Sepharose

Alle Puffer wurden vor Gebrauch steril filtriert und bei 4 °C gelagert.

Die mit Concanavalin A Sepharose gefüllte Säule (14 mL CV) wurde mit 70 mL Con A Waschpuffer (Flussrate 1,5 mL/min) äquilibriert, dann wurde das Retenat der Tangentialflussfiltration mit einer Flussrate von 1,0 mL/min auf die Säule geladen. Anschließend wurde so lange mit Con A Waschpuffer (Flussrate 1,5 mL/min) gewaschen, bis die Leitfähigkeit

Tabelle 6.13: Puffer für die Concanavalin A Sepharose Chromatographie

Puffer	Zusammensetzung
ConA Waschpuffer ASAH	30 mmol/L Tris/HCl, 0,2 mol/L NaCl, pH 7,2
ConA Elutionspuffer ASAH	30 mmol/L Tris/HCl, 0,2 mol/L NaCl, 15% (w/v) Methyl- α -D-mannopyranosid, pH 7,2

und UV-Spur ihren Ausgangswert wieder erreicht hatten (dies war nach Waschen mit etwa 100 - 140 mL Puffer der Fall). Die Elution der gebundenen Glykoproteine erfolgte in normaler Flussrichtung mit einem linearen Gradienten von 0- 15% Methyl- α -D-glucopyranosid (Gradient: 25 min bis 100% B Elutionspuffer, Flussrate 1,5 mL/min, Fraktionsgröße 3 mL). Es wurde mit 100 - 140 mL Elutionspuffer nacheluiert, bis die UV-Spur konstant blieb. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden vereint. Die Abbildung Abb. A.9 zeigt ein typisches Chromatogramm.

Die Säule wurde zunächst gründlich mit Wasser (millipore) gespült, bevor mit 140 mL Con A Regenerationspuffer (Con A Waschpuffer mit 1 mol/L NaCl, 0,1 mmol ZnCl₂, 1 mmol CaCl₂·6H₂O, 1 mmol MgCl₂, 1 mmol MnCl₂; Flussrate 1,5 mL/min) in umgekehrter Flussrichtung regeneriert wurde.

Für die Verwendung des Proteins in enzymatischen Assays war eine weitere chromatographische Aufreinigung nicht erforderlich, es wurde daher lediglich mit Hilfe von Zentrifugationsfilter (Amicon Ultra 15, 30.000 MWCO; Zentrifugation bei 4300g, 4 °C, jeweils 15 min) aufkonzentriert. Die Lagerung erfolgte in flüssigem N₂.

6.3.4 Anreicherung der neutralen Sphingomyelinase aus Kalbshirn

Alle Arbeiten erfolgten nach dem von B. Liu und Y. Hannun etablierten Protokoll [114].

Aufschluss des Hirnpräparats

Das Kalbshirn wurde frisch vom Schlachthof in Berlin-Westhafen bezogen und am gleichen Tag verarbeitet.

- stripping-Verfahren

Das Hirn wurde zunächst aus der Hirnschale heraus geholt, mit Wasser (millipore) gründlich abgespült, auf eine sterile Polyethylenunterlage gelegt und auf Eis gebettet. Mit einer Pinzette wurde das Membranhäutchen vorsichtig abgezogen. Danach wurde das Hirn nochmals mit Wasser (millipore) gespült und abschließend mit PBS-Puffer.

- Homogenisation

Alle Puffer wurden vor Gebrauch steril filtriert und bei 4 °C gelagert.

Tabelle 6.14: Puffer für die Homogenisation des Hirnpräparats

Puffer	Zusammensetzung
Solubilisierungspuffer	50 mmol Tris/HCl, 1 mmol EDTA, 1 mmol EGTA, 5 mmol DTT, 5 mmol β -Mercaptoethanol, Protease-inhibitor complete mini, 1,7 % (v/v) TritonX 100, pH 7,4

Mit Hilfe eines Skalpells wurde das Hirn in zwei Hälften geteilt und diese wiederum in vier Stücke geschnitten. Für die weitere Verarbeitung wurden nur vier Stücke verwendet. Jedes Stück wurde einzeln in den Glaskörper des Teflonhomogenisators überführt, mit 10 mL eisgekühltem Homogenisationspuffer aufgeegossen und mit dem Teflonstab püriert. Die Suspension (ca. 75 mL) wurde 15 min bei 1000g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde auf Beckmann-Ultrazentrifugenröhrchen (4,7 mL pro Tube, austarieren mit Homogenisationspuffer) verteilt und diese 90 min bei 49.000g und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde in zwei Volumen (15 mL) Solubisierungspuffer resuspendiert und 120 min bei 4 °C auf dem Taumelrollenmischer inkubiert. Anschließend wurde die Lösung in Beckmann-Ultrazentrifugenröhrchen überführt und 60 min bei 46.000g, 4 °C zentrifugiert. Der Überstand (15 mL) wurde abgenommen, mit einem Volumen (15 mL) Äquilibrierungspuffer verdünnt und danach steril filtriert (0,45 μ m).

Chromatographische Anreicherung

Alle Puffer wurden vor Gebrauch steril filtriert und bei 4 °C gelagert.

Tabelle 6.15: Puffer für die Anionenaustauschchromatographie an QXL-Sephrose

Puffer	Zusammensetzung
Äquilibrierungspuffer	20 mmol Tris, 1 mmol EDTA, 1 mmol EGTA, 1 mmol PMSF, Proteaseinhibitor complete, pH 7,4
Waschpuffer	20 mmol Tris, 1 mol NaCl, 1 mmol EDTA, 1 mmol EGTA, 1 mmol PMSF, Proteaseinhibitor complete, pH 7,4
Elutionspuffer	20 mmol Tris, 1 mol NaCl, 1 mmol EDTA, 1 mmol EGTA, 1 mmol PMSF, Proteaseinhibitor complete, 1,1 % (v/v) Tritonx 100, pH 7,4

Eine mit QXL-Sephrose (starker Anionenaustauscher) gefüllte Säule (1 mL CV) wurde mit 25 mL Äquilibrierungspuffer äquilibriert (Flussrate 1,5 mL/min). Dann wurde die Enzympräparation mit einer Flussrate von 1,5 mL/min auf die Säule geladen. Anschließend wurde mit 20 mL Äquilibrierungspuffer gewaschen (Flussrate 1,5 mL/min, bevor in einem linearen Gradienten (2 CV) von 0 - 1 mol/L NaCl in Waschpuffer umgestellt wurde (Gradient: 2 min bis 100% B Waschpuffer, Flussrate 1,0 mL/min). Es wurde mit 8 mL Waschpuffer gewaschen, danach erfolgte die Elution der gebundenen Proteine in einem linearen Gradienten von 0 - 1,1% Triton X-100 in Elutionspuffer (Gradient: 10 min bis 100% B Elutionspuffer, Flussrate 1,0 mL/min, Fraktionsgröße 1 mL). Es wurde mit 20 mL Elutionspuffer nacheluiert. Die Fraktionen mit den höchsten Aktivitäten wurden vereint. Die Lagerung erfolgte in flüssigem N₂. Die Abbildung Abb. A.10 zeigt ein typisches Chromatogramm.

6.3.5 Expression der neutralen Sphingomyelinase in *E. coli* Rosetta

Das Plasmid pET-32a-nSMase 2 wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe M. Nikolova-Karakashian (Department of Physiology and Sanders Brown Center on Aging, University of Kentucky, Lexington, Kentucky) zur Verfügung gestellt. Die Transformation des Plasmids in *E. coli* Rosetta2 (DE3)-pLysS-Bakterien wurde wie bereits beschrieben vorgenommen, die Selektion der transformierten Klone erfolgte auf Ampicillin-haltigen Agarplatten.

In einem sterilen Erlenmeyerkolben wurden 250 mL LB-Medium mit 8 mL einer entsprechenden Übernachtskultur *E. coli* Rosetta nSMase 2 angeimpft (30:1 Verdünnung) und 3 Stunden bei 150rpm, 37°C inkubiert (OD₆₀₀ 0,2- 0,6). Nach Zugabe von 500 µL einer 500mM IPTG-Lösung (119 mg/mL Wasser) wurde für weitere 4 Stunden inkubiert. Anschließend wurde die Kulturlösung zentrifugiert (4300g, 10 min, 4°C), der Überstand verworfen und die Zellen in 10 mL PBS-Puffer aufgenommen. Aliquots dieser Suspension (1 mL pro Eppendorfreaktionsgefäß) wurden mit der freeze-thaw-Methode (Schock frieren in flüssigem Stickstoff sowie anschließendes Erwärmen auf 37°C, dreimalige Wiederholung) aufgeschlossen. Im Fall einer starken Viskosität der Lösung wurde DNase I hinzugefügt (Inkubation 30 min auf Eis), bevor die Enzympräparation bei -20°C gelagert werden konnte.

Aufgrund der starken Sensibilität gegenüber Detergenzien war eine weitere Anreicherung des Proteins durch nachfolgende Reinigungsschritte nicht möglich. Ebenso konnte die Präparation nicht als Enzymquelle für den mizellaren Sphingomyelinase-Assay genutzt werden, die Verwendung ist auf Detergenz-freie Assaysysteme beschränkt.

6.3.6 Proteinanalytik

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Proteine wurden entsprechend der Methode nach Laemmli [182] in kontinuierlichen, denaturierenden und reduzierenden Gelen separiert.

Tabelle 6.16: Herstellung der Gele

			Trenngel 10%	Sammelgel 5%
H ₂ O			1,68 mL	1,5 mL
Tris pH 8,8	1,5 mol/L		1,6 mL	—
Tris pH 6,8	1,0 mol/L		—	293 µL
Acrylamidmix-Lösung	30%		960 µL	384 µL
SDS-Lösung	10% in H ₂ O		40 µL	24 µL
Ammoniumpersulfat-Lösung	10% in H ₂ O		16 µL	12 µL
TEMED			2,5 µL	2,3 µL

Die Proben wurden vor Beginn des Laufs mit 2x Probenpuffer (Sample Buffer, Laemmli, 2x concentrate, Sigma Aldrich) versetzt und 5 min auf 95 °C erhitzt. Die Elektrophorese erfolgte in 10 x 10 cm Vertikalgelen (0,5 mm Dicke, 10 bzw. 15 Taschen zum Probenauftrag) ca. 2,5 Stunden bei 120V in Laufpuffer (Zusammensetzung /L: 3 g Tris Base, 14,4 g Glycin, 10 mL 10% SDS-Lösung). Als Größenstandard wurde der Precision Plus Protein Standard Dual Color der Firma Biorad verwendet.

Die Visualisierung der Proteinbanden erfolgte mit dem ProteoSilver Silver Stain Kit (Sigma Aldrich). Zunächst wurden das Gel vorsichtig von den Glasplatten abgelöst, mit Wasser gespült und 30 min fixiert (Fixierlösung: 50 mL Ethanol, 10 mL Essigsäure, 40 mL Wasser). Anschließend wurde 10 min mit 100 mL 30% Ethanol und weitere 10 min mit 200 mL Wasser gewaschen. Dann wurde das Gel 10 min in Sensitizer-Lösung (1 mL PS Sensitizer, 99 mL Wasser) inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit 200 mL Wasser (jeweils 10 min) wurde das Gel 10 min in Silber-Lösung (1 mL PS Silber, 99 mL Wasser) inkubiert und nachfolgend nochmals 1 min mit 200 mL Wasser gewaschen. Durch Zugabe der Entwickler-Lösung (5 mL Developer I, 0,1 mL Developer II, 95 mL Wasser) konnte das Erscheinen der Proteinbanden beobachtet werden, die Entwicklungszeit betrug 3 bis 12 min. Der Prozess wurde durch Hinzufügen der Stopplösung (5 mL, 5 min) beendet. Abschließend wurde das Gel 15 min in 200 mL Wasser gewaschen und danach eingescannt. Die Abbildung Abb. 3.5 zeigt ein typisches Bild.

Western Blot

Nach der Auftrennung der Proteine mittels PAGE konnten sie immunochemisch nachgewiesen werden [183]. Dazu war im ersten Schritt der elektrophoretische Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran erforderlich (Tank-Blotting). Der Aufbau der Blotting-Apparatur erfolgte entsprechend des Anwendungsprotokolls der Herstellerfirma Biorad. Für die SDS-PAGE wurde anstatt des normalen Größenstandards der Precision Plus Protein WesternC-Standard der Firma Biorad verwendet.

Das Gel, die Nitrocellulosemembran sowie Schwämme und Whatman-Papiere wurde in gekühltem Transferpuffer (Zusammensetzung /L: 3 g Tris Base, 14,4 g Glycin, 2 mL 10% SDS-Lösung, 200 mL Ethanol) getränkt. Nach Entfernen des Sammelgels wurde ein Sandwich aus Whatman-Papieren, Trenngel und Nylonmembran zusammengesetzt. Die unter Puffer verschlossene Kassette wurde in die Blot-Apparatur eingehängt und mit Transferpuffer aufgefüllt. Unter Eiskühlung erfolgte der Transfer bei 135V für 90 min.

Für den immunochemischen Nachweis wurde das Western Breeze Chromogenic Immunodetection System (Invitrogen) und eine Wippbank (Rocking Shaker) benutzt. Die in ein Schälchen überführte Membran wurde zuerst zweimal mit 20 mL Wasser 5 min bei Raumtemperatur gewaschen und danach mit Blocking-Lösung 30 min inkubiert. Anschließend wurde zweimal mit 20 mL Wasser für jeweils 5 min gespült. Nach Zugabe des ersten Antikörpers (2,5 µL anti-ASM-Stocklösung verdünnt in 2 mL erster Antikörperlösung) wurde die Inkubation der Membran über Nacht bei 4 °C fortgesetzt. Daran schloss sich ein Waschprotokoll (3x 5 min mit 20 mL Antikörper-Waschlösung) an. Es folgte die Zugabe des zweiten Antikörpers (10 mL antiZiege-Antikörperlösung) und die Inkubation für 45 min bei Raumtemperatur. Daran schloss sich erneut das Waschprotokoll (3x 5 min mit 20 mL Antikörper-Waschlösung) an. Die Membran wurde nochmals zweimal mit 20 mL Wasser für jeweils 2 min gespült, dann mit 5 mL Chromogenic-Substratlösung inkubiert (1 bis 60 min) und abschließend wieder zweimalig mit 20 mL Wasser für jeweils 2 min gespült. Nach dem Trocknen der Membran im Trockenschrank (37 °C) konnte sie zu Dokumentationszwecken eingescannt werden.

Proteinquantifizierung mit BCA

Um die Konzentration von Proteinen (sowohl bei der Aufreinigung von rekombinant-exprimierten Proteinen, als auch in Zelllysaten) zu bestimmen, wurde das QuantiPro BCA Assay Kit (Sigma Aldrich) verwendet. Die Methode beruht auf der Verschiebung des Extinktionsmaximums eines Kupferkomplexes, bedingt durch das Anbinden der Proteine [184].

Zunächst wurde die Konzentration der Probe grob abgeschätzt, um eine geeignete Verdünnung des Proteins im vorgegebenen Probenvolumen (100 μL) zu erzielen. Die Tabelle Tab. 6.17 zeigt einige Beispiele.

Tabelle 6.17: Verdünnungen für den BCA-Assay

	Verdünnung
Vivaflow-Konzentrat	1 μL + 99 μL H_2O
Con A Eluat	10 μL + 90 μL H_2O
Butyl-S Eluat	20 μL + 80 μL H_2O
Mono Q Eluat	25 μL + 75 μL H_2O
Zelllysate	10 μL + 90 μL H_2O

In einem unbeschichteten, klaren 96 well Assay-plate wurden pro Vertiefung 100 μL Proteinprobe mit 100 μL Working-Reagenz vermischt. Das Working-Reagenz wurde immer frisch aus 25 Teilen Lösung QA, 25 Teilen Lösung QB und einem Teil Lösung QC hergestellt (z.B. für 10 Proben: 500 μL QA + 500 μL QB + 20 μL QC). Das abgeklebte plate wurde 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Extinktion am Plattenlesegerät (Modus: Absorption) gegen eine Kalibrierreihe (BSA-Standardlösungen 5 – 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, mit Hilfe der Geradengleichung und unter Einbeziehung der Verdünnungsfaktoren konnten die Konzentrationen der Proteinproben berechnet werden).

6.3.7 Bestimmung der Aktivität von Proteinen

Die enzymatische Aktivität von Proteinen ist ein wichtiges Instrument, um z.B. den Erfolg eines Reinigungsprotokolls, die Qualität eines Enzyms (spezifische Aktivität) oder die Güte eines Inhibitors beurteilen zu können. Meist stehen dafür mehrere, voneinander unabhängige Messverfahren zur Verfügung, die jeweils spezifische Vor- und Nachteile aufweisen.

mizellarer Sphingomyelinase-Assay

Der Assay wurde in leicht modifizierter Form nach dem Protokoll von Quintern [101] durchgeführt.

Der Assay basiert auf der Spaltung des radioaktivmarkierten [N-methyl- ^{14}C] Sphingomyelin-Substrats durch die Sphingomyelinase im Detergenz-haltigen System.

Tabelle 6.18: Reagenzien für den mizellaren Sphingomyelinase-Assay

	Zusammensetzung
^{14}C -Sphingomyelin-Substratlösung	3, 75 $\mu\text{mol/L}$ ^{14}C -Sphingomyelin (ca. 10.000 cpm) in ASM-Assaypuffer
ASM-Assaypuffer	20 mmol/L Citronensäure (3, 84 g/L), 20 mmol/L Na-Citrat (5, 88 g/L),
0,1% TritonX-100, pH 5	
Folchlösung	Chloroform/ Methanol v/v 2:1

Das für den Assay benötigte Volumen an ^{14}C -Sphingomyelin-Stocklösung (0,1mM in Toluol/ Ethanol) wurde dem Vorratsgefäß entnommen, im Stickstoffstrom beim 37°C eingedampft und anschließend in ASM-Assaypuffer resuspendiert. Dabei sind 37, 5 μL ^{14}C -Sphingomyelin-Stocklösung für den Erhalt von 1 mL ^{14}C -Sphingomyelin-Substratlösung ausreichend (entspricht 150 pmol ^{14}C -Sphingomyelin pro Reaktionsansatz). Zur Generierung der Mizellen wurde die ^{14}C -Sphingomyelin-Substratlösung mehrfach abwechselnd geschüttelt (Vortex) und beschallt (Ultraschallgerät). Von dieser Lösung wurden anschließend 40 μL entnommen und mit 1 μL rekombinanter ASM und 9 μL ASM-Assaypuffer vermischt (entspricht ca. 25 ng ASM pro Reaktionsansatz). Die Proben wurden 30 min bei 37°C , 350rpm im Heizblock inkubiert. Die Reaktion wurde mit 800 μL Folchlösung gestoppt. Durch Zugabe von 250 μL Wasser und ausschütteln (Vortex 2 min) konnte das radioaktiv markierte Phosphorylcholin in die wässrige Oberphase überführt werden und somit vom zweiten Spaltprodukt, dem hydrophoben Ceramid separiert werden. Die Phasentrennung wurde durch 10 minütiges Zentrifugieren herbeigeführt. Von der wässrigen Oberphase

wurden dann 200 μL abgenommen und mit 4 mL Szintillationscocktail gut durchmischt. Die Radioaktivität wurde mittels Szintillationszähler bestimmt, dabei ist der cpmB-Wert (counts per minute) direkt proportional zur Menge des vom Enzym umgesetzten Substrates.

mizellarer Sphingomyelinase-Assay zur Bestimmung der Enzymkinetik

Für die Messungen zur Bestimmung der Enzymkinetik wurde eine $^{12/14}\text{C}$ -Sphingomyelin-Substratlösung verwendet. Dazu wurde ein entsprechendes Volumen an ^{14}C -Sphingomyelin-Stocklösung (0,05mM in Toluol/ Ethanol) dem Vorratsgefäß entnommen, mit einer unmarkierten Sphingomyelin-Stocklösung (1,37mM in Chloroform/ Methanol) vermischt und im Stickstoffstrom beim 37 °C eingedampft. Durch Resuspendieren in ASM-Assaypuffer konnte eine $^{12/14}\text{C}$ -Sphingomyelin-Substratlösung der Konzentration 0,5mM erhalten werden (z.B. Mischen von 1062,5 μL ^{14}C -Sphingomyelin-Stocklösung mit 271,8 μL ^{12}C -Sphingomyelin-Stocklösung und Resuspendieren in 850 μL ASM-Assaypuffer, Faktor 1:8). Die Generierung der Mizellen aus der $^{12/14}\text{C}$ -Sphingomyelin-Substratlösung erfolgte wie oben beschrieben. Von dieser Lösung wurden anschließend die benötigten Volumina entnommen und mit 25 ng rekombinanter ASM versetzt (Wildtyp bzw. Varianten). Das Gesamtvolumen pro Reaktionsansatz wurde durch Zugabe von ASM-Assaypuffer (P) auf 50 μL eingestellt (vergleiche Tab. 6.19). Für die Substratkonzentrationen 25 μM - 2,5 μM wurden 1:10 Verdünnungen eingesetzt. Die Untergrundreaktion wurde durch Inkubation von $^{12/14}\text{C}$ -Sphingomyelin-Substratlösung mit ASM-Assaypuffer ohne Enzymquelle bestimmt.

Tabelle 6.19: Reaktionsansätze für die Messungen zur Enzymkinetik

Mizellen	Blank (P)	WT	R289H	H421Y	R496L	[μL]
30	20	5,5	4,2	10	5,0	
20	30	5,5	4,2	10	5,0	
10	40	5,5	4,2	10	5,0	
5	45	5,5	4,2	10	5,0	
25	25	5,5	4,2	10	5,0	
10	40	5,5	4,2	10	5,0	
7,5	42,5	5,5	4,2	10	5,0	
5	45	5,5	4,2	10	5,0	
2,5	47,5	5,5	4,2	10	5,0	

Die Proben wurden 30 min schüttelnd bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Die Reaktion wurde mit 400 µL Folchlösung gestoppt. Durch Zugabe von 100 µL Wasser und ausschütteln (Vortex 2 min), sowie 10 minütiges Zentrifugieren, wurde die organische von der wässrigen Phase separiert. Von der wässrigen Oberphase wurden dann 200 µL abgenommen und mit 4 mL Szintillationscocktail gut durchmischt. Die Radioaktivität wurde mittels Szintillationszähler bestimmt.

liposomaler Sphingomyelinase-Assay

Der Assay wurde in Bonn entsprechend den Protokollen von B. Breiden (modifiziert nach [175] und [181]) durchgeführt.

Der Assay basiert auf der Spaltung des radioaktivmarkierten [¹⁴C Fettsäure] Sphingomyelin-Substrats durch die saure Sphingomyelinase im Detergenz-freien System. Dabei kann die Anbindung des Enzyms an eine Membran (die Liposomen) simuliert werden.

Tabelle 6.20: Reagenzien für den liposomalen Sphingomyelinase-Assay

	Zusammensetzung
unmarkierte Lipide DOPC, Chol, DPPA	verschiedene Stammlösungen (1 mg/mL- 2 mg/mL) in CHCl ₃ / MeOH (v/v 1:1)
unmarkierte Sphingomyelin-Stammlösung	1 mg/mL in CHCl ₃ / MeOH (v/v 1:1)
¹⁴ C-Sphingomyelin-Stammlösung	0,1 mmol/L in Toluol/ EtOH (v/v 1:1)
Assaypuffer	20 mmol/L Na-Citrat, 150 mmol/L NaCl, pH 5.0

Die für den Assay benötigten Volumina an Lipiden (vergleiche Tab. ??) wurden den Vorratsgefäßen entnommen, im Stickstoffstrom beim 37 °C getrocknet und anschließend in 1 mL Assaypuffer rehydratisiert. Die Suspension wurde mehrfach abwechselnd geschüttelt (Vortex) und beschallt (Ultraschallgerät).

Anschließend wurde die Lösung in flüssigem Stickstoff schockgefroren und unter schütteln bei 65 °C aufgetaut (8 Zyklen). Die Generierung der Liposomen erfolgte durch wiederholtes Drücken der Lösung (19 mal) durch zwei aufeinanderliegende Polycarbonatmembranen (Liposofast-Extruder; Porendurchmesser der Membranen 100 nm, vorher mit 500 µL Assaypuffer befeuchtet und mit 250 µL Lipidsuspension gesättigt). Zur Aufbewahrung wurden die Liposomen in ein siliconisiertes Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und bei 4 °C belassen.

Tabelle 6.21: Zusammensetzung der Liposomen

Lipid		Konzentration der Stammlösung	Volumen
DOPC	60 mol%	2 mg/mL	47,2 µL
Chol	10 mol%	1 mg/mL	7,7 µL
DPPA	20 mol%	1 mg/mL	26,8 µL
SM	9,5 mol%	1 mg/mL	13,9 µL
¹⁴ C-SM	0,5 mol%	0,1 mmol/L	20 µL

Für den Assay wurden von dieser Lösung pro Reaktionsansatz 40 µL eingesetzt und mit 300 ng rekombinanter ASM (Wildtyp bzw. Varianten) gemischt. Durch Zugabe einer entsprechenden Menge Assaypuffer wurde das Gesamtvolumen auf 100 µL eingestellt. Die Proben wurden 120 min bei 37 °C, schüttelnd im Wasserbad inkubiert, anschließend wurde die Reaktion mit 350 µL CHCl₃/ MeOH (1:2) gestoppt. Der gesamte Reaktionsansatz wurde über Nacht bei 60 °C eingedampft und danach in 50 µL CHCl₃/ MeOH (1:1) aufgenommen. Zur Rehydratisierung wurde die Mischung 2 min geschüttelt (Vortex), 5 min beschallt (Ultraschallbad) und 2 min zentrifugiert. Mit Hilfe einer Kapillare wurden die Proben auf eine TLC-Platte aufgetragen und diese in einer vorbereiteten TLC-Kammer in CHCl₃/ MeOH/ H₂O (60:25:4) entwickelt. Die getrocknete Platte konnte abschließend auf einen Screen aufgelegt und nach einer Entwicklungszeit von zwei Tagen mit dem BAS Reader ausgelesen werden.

Untersuchungen zur Sphingomyelin-Speicherung in humanen ASM-defizienten Fibroblastenzellen (NPA -/-) durch Zugabe von L(3-¹⁴C)Serin

Humane Hautfibroblasten (NP Typ A-/- Mutation unbekannt, zeigen nach metabolischer Markierung starke SM-Speicherung, Bezugsquelle E. Schuchman) und entsprechende Wildtyp-Zellen wurden in 25 cm² Zellkulturflaschen bis zur 75%igen Konfluenz in 5 mL DMEM (high glucose) mit 10% FCS und 1% Pen/ Strep kultiviert. Um eine möglichst hohe Aufnahme an L(3-¹⁴C)Serin zu gewährleisten, wurden die Zellen zu Beginn der metabolischen Markierung dreimal mit PBS gewaschen und 2 Stunden in MEM mit 0,3% FCS inkubiert, dann wurde das Inkubationsmedium gegen das Fütterungsmedium MEM mit 0,3% FCS und 1% Pen/ Strep ausgetauscht (2,5 mL pro Flasche). Nach Zugabe von 50 µL L(3-¹⁴C)Serin (2,15 GBq/mmol) wurden die Zellen weitere 24 Stunden inkubiert. Danach wurde das Medium abgenommen und der Zellrasen dreimal mit PBS-Puffer gewaschen. Anschließend wurden 5 mL Wachstumsmedium sowie 50 µg Enzym (WT-ASM, R289H, H421Y oder R496L) hinzugefügt und die Inkubation über Nacht fortgesetzt. Die Zugabe

des Enzyms wurde alle 24 Stunden wiederholt, insgesamt wurde pro Flasche dreimalig Enzym zugesetzt. Nach einer Gesamt-Inkubationszeit von 72 Stunden wurde das Medium vom Zellenrasen entfernt und dieser mit 2 mL PBS-Puffer gewaschen. Durch Inkubation mit Trypsin (15 min, 37 °C) wurden die Zellen abgelöst, die homogenisierte Suspension wurde in Schraubkappengläser überführt. Die Zellkulturflasche wurde mit PBS-Puffer nachgewaschen und die Waschlösung zu dem Inhalt der Schraubkappengläser gegeben. Nach einem Zentrifugationsschritt (5 min, 4 °C, 5000 rpm) wurde der Überstand abgenommen, das Zellpellet in 1 mL PBS-Puffer aufgenommen (Vortex) und wiederum zentrifugiert. Der Waschschrift wurde nochmals wiederholt, dann wurde der Überstand vollständig abgetrennt. Nun wurde das Zellpellet schockgefroren (erster Lyseschrift), zum Auftauen mit 1 mL millipore Wasser versetzt und anschließend drei mal für jeweils 30 sec beschallt (zweiter Lyseschrift). Zur Extraktion der Lipide wurden pro Glas 4 mL Methanol und 3 mL Extraktionsmischung (Chloroform/ Methanol/ Wasser v/v 10:5:1) zugegeben und 48 Stunden im Wasserbad bei 37 °C geschüttelt. Die abgekühlten Proben wurden danach 5 min zentrifugiert und das Lösungsmittel über ein vorbereitetes Filtersäulchen in ein neues Schraubkappenglas überführt. Das alte Schraubkappenglas wurde mit 2 mL Chloroform/ Methanol (v/v 1:1) gespült, geschüttelt (Vortex) und zentrifugiert, bevor der Überstand ebenfalls über die Filtersäule gereinigt und mit dem ersten Filtrat vereinigt werden konnte. Anschließend wurden dem Filtrat (ca. 10 mL pro Glas) 250 µL 4M Natronlauge zugesetzt und eine alkalische Hydrolyse im Wasserbad (37 °C, 2 Stunden) durchgeführt. Durch Zugabe von 15 µL Eisessig wurden die Proben neutralisiert und dann im Stickstoffstrom eingedampft.

In Pasteurpipetten, deren Auslauf mit silanisierter Glaswolle abgedichtet worden war, wurden 1,5 mL RP-18/ Methanol-Suspension (w/v 1:1) gefüllt. Das Säulenbett wurde mit 1 mL Methanol, 2 mL Wasser (bidestilliert und entgast), 1 mL Methanol, 2 mL Chloroform/ Methanol (v/v 1:1), 1 mL Methanol und abschließend 2 mL Chloroform/ Methanol/ Wasser (bidestilliert, 0,1M KCl) (v/v/v 3: 48: 47) gewaschen und äquilibriert. Die getrockneten Lipide wurden in 1 mL Methanol aufgenommen, 5 min beschallt (Ultraschallbad), mit 1 mL 300mM wässriger Ammoniumacetatlösung versetzt und unverzüglich auf vorbereitete RP-18 Säulen aufgetragen. Restliche Lipide wurden mit einer Mischung aus 1 mL Methanol und 1 mL Ammoniumacetatlösung von der Glaswand des Probengefäßes gespült (Vortex) und ebenfalls aufgetragen. Salze und andere wasserlösliche Substanzen konnten mit 6 mL Wasser (bidestilliert) von der Säule gewaschen werden. Anschließend wurde ein Phasenabgleich mit 400 µL Methanol vorgenommen, der Durchlauf wurde verworfen. Durch Zugabe von zunächst 600 µL Methanol und darauf folgend 8 mL Chloroform/ Methanol (v/v 1:1) wurden die gewünschten Lipide von der Säule eluiert. Das Lösungsmittel wurde

unter Stickstoffstrom bei 37 °C abgedampft, die Lipide in 1 mL Chloroform/ Methanol (v/v 1:1) resuspendiert und Aliquots von 10 µL mittels Szintillationszähler vermessen. Die nochmalig eingedampften Lipide wurden abschließend in 50 µL Chloroform/ Methanol (v/v 1:1) aufgenommen und wie beschrieben mittels TLC aufgetrennt. Pro Bahn wurden etwa 25.000 cpm aufgetragen. Die Entwicklungszeit des Screens betrug drei bis vier Tage. Die Versuchsreihe wurde ebenso mit dem Proteaseinhibitor Leupeptin durchgeführt, dabei wurden die Zellen wie beschrieben kultiviert, mit L(3-¹⁴C)Serin versetzt und eine Stunde mit 25 µmol/L Leupeptin vorinkubiert. Anschließend wurden die Enzyme (150 µg WT-ASM, R289H, H421Y oder R496L) zugegeben und die Zellen weitere 48 Stunden inkubiert. Die Aufarbeitung der Zellen erfolgte in identischer Weise.

MOSCERDAM-Assay

Die Durchführung des Assays entspricht der von O.P. van Diggelen entwickelten Methode ([185]).

Der Assay basiert auf der Spaltung eines fluoreszenzmarkierten Sphingomyelin-Substratanalogons durch Sphingomyelinase.

Tabelle 6.22: Reagenzien für den MOSCERDAM-Assay

	Zusammensetzung
Substratpuffer	0,1 mol/L NaOAc mit 0,2% Na-Taurocholat, 0,02% NaN ₃ , pH 5,2
Substratlösung	10 mg HMUPC gelöst in 12,6 mL Substratpuffer
Stoppuffer	0,5 mol/L NaHCO ₃ / 0,5 mol/L Na ₂ CO ₃ , 0,25% TritonX-100, pH 10,7

In einem unbeschichteten, schwarzen 96 well Assay-plate wurden pro Vertiefung 10 µL Proteinprobe (rekombinate ASM oder Zelllysate) mit 10 µL Substratpuffer und 10 µL HMUPC-Lösung vermischt. Das abgeklebte Plate wurde üblicherweise 30 min (Verwendung von rekombinatem Enzym) bzw. 2 Stunden (Verwendung von Zelllysate als Enzymquelle) 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 200 µL Stoppuffer pro Vertiefung wurde die Fluoreszenz der Proben am Plattenlesegerät (Modus: Fluoreszenz, Filter Em 450 nm, Filter Ex 380 nm) bestimmt. Die Quantifizierung der enzymatischen Aktivität erfolgte durch Vergleich der Fluoreszenz von Messproben und Kontrollproben.

6.4 Allgemeine Techniken

Herstellung von LB Medium

Zur Herstellung von LB Medium wurde das LB-Broth (Lennox)-Pulver der Firma Roth verwendet. 20 g Trockenmedium wurden mit 1 L destilliertem Wasser vermischt und 15 min bei 121 °C autoklaviert. Die Lagerung erfolgte bei Zimmertemperatur.

Herstellung von Antibiotika-haltigen LB-Agar-Platten

In einem Erlenmeyerkolben wurden 10 g LB-Trockenmedium und 5 g Agarosepulver (Select Agar, Firma Invitrogen) mit 500 mL destilliertem Wasser versetzt und 15 min bei 121 °C autoklaviert. Nach dem Erkalten der Lösung konnten die benötigten Antibiotika zugegeben werden.

- Herstellung von LB-Agarplatten für die Ampicillin-Selektion

100 mL sterilisierte und erkaltete LB-Agaroselösung wurden mit 240 µL Ampicillinlösung (Konzentration der Stocklösung 50 mg/mL) versetzt. Die Lösung wurde anschließend in sterile Petrischalen gegossen, über Nacht im Trockenschrank getrocknet und anschließend bis zur Verwendung im Kühlschrank gelagert.

- Herstellung von LB-Agarplatten für die Blau/Weiss-Selektion

100 mL sterilisierte und erkaltete LB-Agaroselösung wurden mit folgenden Komponenten versetzt. Die Lösung wurde anschließend in sterile Petrischalen gegossen, über Nacht im Trockenschrank getrocknet und anschließend bis zur Verwendung im Kühlschrank gelagert.

Tabelle 6.23: Zusammensetzung der Agarplatten für die Blau/Weiss-Selektion (GKTXI-Platten)

Komponente	Konzentration	Stock
Kanamycin	50 µg/mL	Feststoff
Gentamicin	7 µg/mL	Stocklösung 10 mg/mL
Tetracyclin	10 µg/mL	Stocklösung 10 mg/mL
IPTG	40 µg/mL	Stocklösung 200 mg/mL
X-Gal	100 µg/mL	Feststoff

Gießen von Agarosegelen

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte in nativen, 2% Agarosegelen. Das Verfahren basiert auf der Wanderung der negativ geladenen Nucleinsäuren im elektrischen Feld, wobei die Geschwindigkeit in erster Näherung nur von der Größe der Fragmente abhängig ist. Zur Visualisierung wurde dem Gel Ethidiumbromid zugesetzt. Dieser orange Farbstoff ist in der Lage, mit der Helixstruktur doppelsträngiger DNA zu interkalieren und die sich bildende Komplexverbindung kann anschließend mit UV-Licht angeregt werden. Die Agarosegele wurden folgendermaßen hergestellt: 1 g Agarose wurde in 50 mL Laufpuffer (7 mL 50 x TAE-Puffer verdünnt mit 343 mL Wasser) aufgekocht und nach dem Abkühlen auf ca. 50 °C unter Rühren mit einem Tropfen Ethidiumbromidlösung versetzt. Das noch flüssige Gel wurde in die Kammer gegossen und der Kamm plaziert. Anschließend wurde der restliche Puffer und das Gel 30 min in den Kühlschrank gestellt. Danach konnte das Gel mit den Proben beladen werden. Der Lauf erfolgte üblicherweise bei 70V für 60 min. Durch Auflegen des Gels auf einen UV-Transilluminator konnten die Banden detektiert werden.

Herstellung kompetenter Bakterienzellen

Die im Kühlschrank gelagerte Übernachtskultur der entsprechenden Bakterien wurde mit 400 mL LB Medium versetzt und schüttelnd (115rpm) bei 37 °C bis zum Erreichen einer optischen Dichte (OD_{600}) von 0,6 inkubiert. Anschließend wurde die Kulturlösung eine Stunde auf Eis gekühlt, danach auf 50 mL Reaktionsgefäße (Falcon-Tubes) verteilt und zentrifugiert (4 °C, 10 min, 2700g). Das Medium wurde sorgfältig abdekantiert und die Zellen in jeweils 30 mL $CaCl_2$ -Lösung (100mM, eisgekühlt) vorsichtig resuspendiert. Die Suspension wurde 72 Stunden bei 4 °C gelagert und erneut zentrifugiert (4 °C, 10 min, 2000g). Dann wurden die Zellen in je 2 mL 100mM $CaCl_2$ -Lösung mit 15% Glycerol resuspendiert, 200 μ L Aliquots in sterile Eppendorfreaktionsgefäße überführt und bei –80 °C gelagert.

6.4.1 Generelle Kultivierung von Säugerzellen

Alle Arbeitsschritte erfolgten in einer sterilen Werkbank.

Zur Initiation der Kultur wurde ein Cryo-Röhrchen der entsprechenden Zelllinie aus dem Stickstoff-Dewar entnommen und in der Hand erwärmt. Sobald sich das Zellpellet in dem Cryo-Röhrchen bewegen ließ, wurde es zügig in eine Zellkulturschale (wachstumsfördernd behandelt, 75 cm², mit belüfteter Kappe), die bereits 19 mL des vorgewärmten Kulturmediums enthielt, überführt. Die Schale wurde über Nacht im Brutschrank (37 °C, 5% CO₂)

Tabelle 6.24: verwendete Zelllinien und Kulturmedien

Zelllinie	Medium und Zusätze (Endkonzentration)
HEK 293T	DMEM mit (10%) FCS + (1%) Pen/ Strep
HeLa	DMEM mit (10%) FCS + (1%) Pen/ Strep
Hep G2	DMEM mit (10%) FCS + (1%) Pen/ Strep
B104	DMEM mit (10%) FCS + (1%) Pen/ Strep
NH3T3	DMEM mit (10%) FCS + (1%) Pen/ Strep
Fibroblasten	DMEM mit (10%) FCS + (1%) Pen/ Strep
MDCK	DMEM mit (10%) FCS + (1%) Pen/ Strep
HEK 293 SPL oe	DMEM/ GlutaMAX mit (10%) FCS + (1%) Pen/ Strep + (10mM) HEPES + (1 mg/mL) Geneticin
MDA-MB-321 WT	RPMI/ GlutaMAX + mit (10%) FCS + (1%) Pen/ Strep + (10mM) HEPES
MDA-MB-321 SPL oe	RPMI/ GlutaMAX mit (10%) FCS + (1%) Pen/ Strep + (10mM) HEPES + 400 µg/mL Geneticin

zum Absitzen der Zellen belassen. Danach wurde die gesamte Flüssigkeit vorsichtig aus der Schale gesaugt und durch 20 mL frisches, ebenfalls vorgewärmtes Medium ersetzt. Die Schale wurde bis zum Erreichen von 90% iger Konfluenz inkubiert, anschließend erfolgte die Passagierung. Dazu wurde zunächst das Medium aus der Schale entfernt und der Zellrasen mit 4 mL PBS-Puffer gewaschen, die Waschflüssigkeit wurde verworfen. Nach Zugabe von 1 mL Trypsinlösung und kurzer Inkubation (37 °C maximal 3 min) ließ sich der Zellrasen vom Flaschenboden abschlagen. Die Reaktion wurde durch Hinzufügen von 10 mL Medium gestoppt, ein Aliquot der homogenisierten Zellsuspension wurde in eine neue Kulturschale überführt (meist 1:10 Verdünnung, d.h. 2 mL Zellsuspension versetzt mit 18 mL Medium) und als fortlaufende Passage weitergeführt.

Zellen, die sich in stabilem Wachstum befanden, konnten ebenso zu Lagerzwecken eingefroren werden. Dazu wurde eine ausreichende Zahl an Kulturschalen bereitgestellt, das Kulturmedium entfernt und der Zellrasen wie beschrieben mit PBS-Puffer gewaschen. Nach Zugabe von 10 mL Kulturmedium wurden die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers abgelöst und die homogenisierte Suspension in 15 mL Falcon-Zentrifugationsröhrchen überführt. Die Zentrifugation erfolgte bei 2000g, 2 min, 4 °C. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet zügig in eisgekühltem Freezing Medium (40% Medium ohne Antibiotika, 50% FCS, 10% DMSO; 4 mL Freezing Medium pro Schale) resuspendiert. Die Suspension wurde anschließend auf Cryo-Röhrchen verteilt (ca. 900 µL Suspension pro Röhrchen). Die Röhrchen wurden in den Freezing-Behälter überführt und dieser eine Stunde bei -20 °C,

danach über Nacht bei -80°C gekühlt. Die Lagerung der Zellen wurde in flüssigem Stickstoff in dem dafür vorgesehenen Dewar vorgenommen.

6.4.2 Herstellung von Zelllysaten

Herstellung von Zelllysate aus Säugerzellen

Von den kultivierten Zellen (ca. 95% Konfluenz) wurde das Medium abgenommen und der Zellrasen dreimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit Lysepuffer (PBS + 0,5% NP 40 für Fibroblasten bzw. 20mM Tris, 150mM NaCl, pH 7,4, 2% TritonX 100, Protease-Inhibitor complete mini für HEK 293) versetzt und mit einem Zellschaber abgetragen. Die Suspension wurde 30 min auf Eis inkubiert und danach dreimal für jeweils 30 sec im Ultraschallbad lysiert. Größere Zellfragmente wurden durch kurzes Zentrifugieren abgetrennt. Der klare Überstand konnte direkt für enzymatische Assays verwendet werden.

Herstellung von Zelllysate aus NH3T3-Zellen

In einer 75 m^2 Zellkulturflasche wurden die Zellen bis zur 95%igen Konfluenz kultiviert. Das Kulturmedium wurde entfernt, der Zellrasen mit 4 mL PBS gewaschen und die Zellen durch Zugabe von 1 mL Trypsin abgelöst. Die Reaktion wurde mit 5 mL Medium gestoppt und die homogenisierte Lösung in ein 15 mL Falcon-Zentrifugationsröhrchen überführt. Nach der Zentrifugation (4000g, 10 min, 4°C) wurde der Überstand verworfen, die Zellen in 1 mL PBS resuspendiert und erneut 5 min bei 3000g , 4°C zentrifugiert. Die Aufnahme in PBS und die anschließende Zentrifugation wurde noch einmal wiederholt. Danach wurden die Zellen mit 200 μL 0,2M Suscrose versetzt (Eppendorfreaktionsgefäß) und die Lösung im Ultraschallbad behandelt (ca. 5 min). Restliche Zellfragmente wurden durch kurzes Zentrifugieren (2 min bei voller Zentrifugenleistung) abgetrennt. Aliquots des Überstands (50 μL) konnten nach dem Schockgefrieren (in flüssigem Stickstoff) für etwa 4 Wochen bei -80°C aufbewahrt werden.

Herstellung von BSA/Sphingolipid-Komplexen

250 nmol des in CHCl_3 /Methanol gelösten Lipids wurden in einem Eppendorfreaktionsgefäß zunächst unter Argon-Strom, danach im Vakuum bis zur Trockene eingengt. Anschließend wurde das Lipid in 200 μL Ethanol resuspendiert, mit 10 mL HMEMB vermischt (Vortex) und in einen Dialyseschlauch überführt. Die Dialyse erfolgte unter Rühren über Nacht bei 4°C gegen 500 mL HMEM. Der BSA/Sphingolipidkomplex konnte bei Bedarf mittels

Tabelle 6.25: verwendete Pufferlösungen für die Herstellung der BSA/Sphingolipidkomplexe

Pufferbezeichnung	Zusammensetzung
HMEM	DMEM ohne Phenolrot mit 10mM Hepes
HMEMB	HMEM mit 250mM defatted BSA

Gefriertrocknung in den Feststoff überführt oder direkt als Lösung für mikroskopische Untersuchungen verwendet werden.

6.4.3 Zellproliferationsassay mit WST 1

Die Durchführung der Zellproliferationstests erfolgte den Herstellerangaben entsprechend. Säugerzellen (HeLa oder HepG2) wurden wie beschrieben in Zellkulturflaschen bis zur 95% Konfluenz kultiviert. Nach dem Waschschrift (PBS-Puffer) und dem Abschlagen des Zellrasens durch Trypsinzusatz wurde die Reaktion mit DMEM (ohne Indikator Phenolrot) gestoppt. Die Zellzahl der homogenisierten Lösung wurde mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt. In einer 96 well-Zellkulturtestplatte wurden pro Vertiefung 90 μL dieser Zellsuspension (Konzentration: 2×10^4 Zellen /mL) ausgesetzt und über Nacht kultiviert. Dann wurde ein entsprechend gewählter Inhibitor (z.B. Dexamethasone) in einem Volumen von maximal 10 μL pro Vertiefung hinzugegeben und für 60 min inkubiert. Anschließend wurden pro Vertiefung 10 μL des Zellproliferationsreagenz WST1 hinzugefügt und weitere 30 min inkubiert. Danach wurde die Testplatte auf der Wippbank gründlich geschüttelt. Die Bestimmung der Absorption erfolgte am Plattenlesegerät (Programm: WST, Filter 450 nm).

6.4.4 Zellulärer DNA Fragmentations-ELISA

Die Durchführung des DNA Fragmentations-ELISA erfolgte wie vom Hersteller beschrieben. In einer 96 well-Zellkulturtestplatte wurden pro Vertiefung 90 μL HepG2-Zellen (Konzentration: 2×10^5 Zellen /mL) ausgesät, mit 10 μL BrdU-Lösung (100 $\mu\text{mol/L}$ in PBS) versetzt und über Nacht kultiviert. Nach einem Zentrifugationsschritt (10 min, 300g) wurde die Medium-BrdU-Mischung entfernt. Die Zellen wurden zweimal mit jeweils 100 μL PBS gewaschen und mit 100 μL frischem Kulturmedium (DMEM ohne Phenolrot) versetzt. Anschließend wurde das in Kulturmedium entsprechend verdünnte Apoptose-induzierende Reagenz (z.B. Dexamethasone) in einem Gesamtvolumen von 100 μL pro Vertiefung zugegeben. Die Inkubation erfolgte für 1- 6 Stunden bei 37 °C. Der Überstand wurde in

eine Assay-Testplatte überführt und bei -20°C zwischengelagert. In die Vertiefungen der Zellkulturtestplatte wurden $200\text{ }\mu\text{L}$ Lysepuffer pipettiert und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. $100\text{ }\mu\text{L}$ dieses Überstands wurden ebenfalls in eine Assay-Testplatte überführt und bei -20°C zwischengelagert.

Im nächsten Schritt wurde die Assay-Messplatte (96 wells, unbeschichtet, klar) vorbereitet. Dazu wurden in die Vertiefungen jeweils $100\text{ }\mu\text{L}$ anti-DNA-coating-Lösung gegeben und 60 min bei 37°C inkubiert. Danach wurde die Lösung entfernt und unspezifische Bindungsstellen durch Zugabe von $200\text{ }\mu\text{L}$ Lysepuffer blockiert. Die Inkubation der abgedeckten Messplatte erfolgte 30 min bei Raumtemperatur. Die Pufferlösung wurde entfernt, jede Vertiefung dreimal mit je $250\text{ }\mu\text{L}$ Waschpuffer gewaschen und die Waschlösung verworfen. Anschließend wurden in die Vertiefungen jeweils $100\text{ }\mu\text{L}$ der oben genannten Überstände (Kulturüberstand oder Lyseüberstand) gegeben, die Messplatte sorgfältig abgedeckt und über Nacht bei 4°C inkubiert.

Die Lösung wurde abgenommen und jede Vertiefung dreimal mit $250\text{ }\mu\text{L}$ Waschpuffer gewaschen. Die letzte Waschlösung wurde in den Vertiefungen belassen und zum Fixieren und Denaturieren der DNA verwendet. Dazu wurde die Messplatte zusammen mit einem 500 mL Becherglas, welches mit 300 mL Wasser gefüllt war, in die Mikrowelle gestellt und 5 min bei 500 Watt bestrahlt. Die Platte wurde 10 min bei -20°C gekühlt, die Fixierlösung verworfen und in jede Vertiefung $250\text{ }\mu\text{L}$ anti-BrdU-POD-Lösung gegeben. Die abgedeckte Platte wurde 90 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit $250\text{ }\mu\text{L}$ Waschpuffer wurden in jede Vertiefung $100\text{ }\mu\text{L}$ Substratlösung pipettiert. Die photometrische Messung erfolgte am Plattenlesegerät (Modus: Absorption, Filter 380 nm).

A Appendix

A.1 Vektorkarten der verwendeten Plasmide

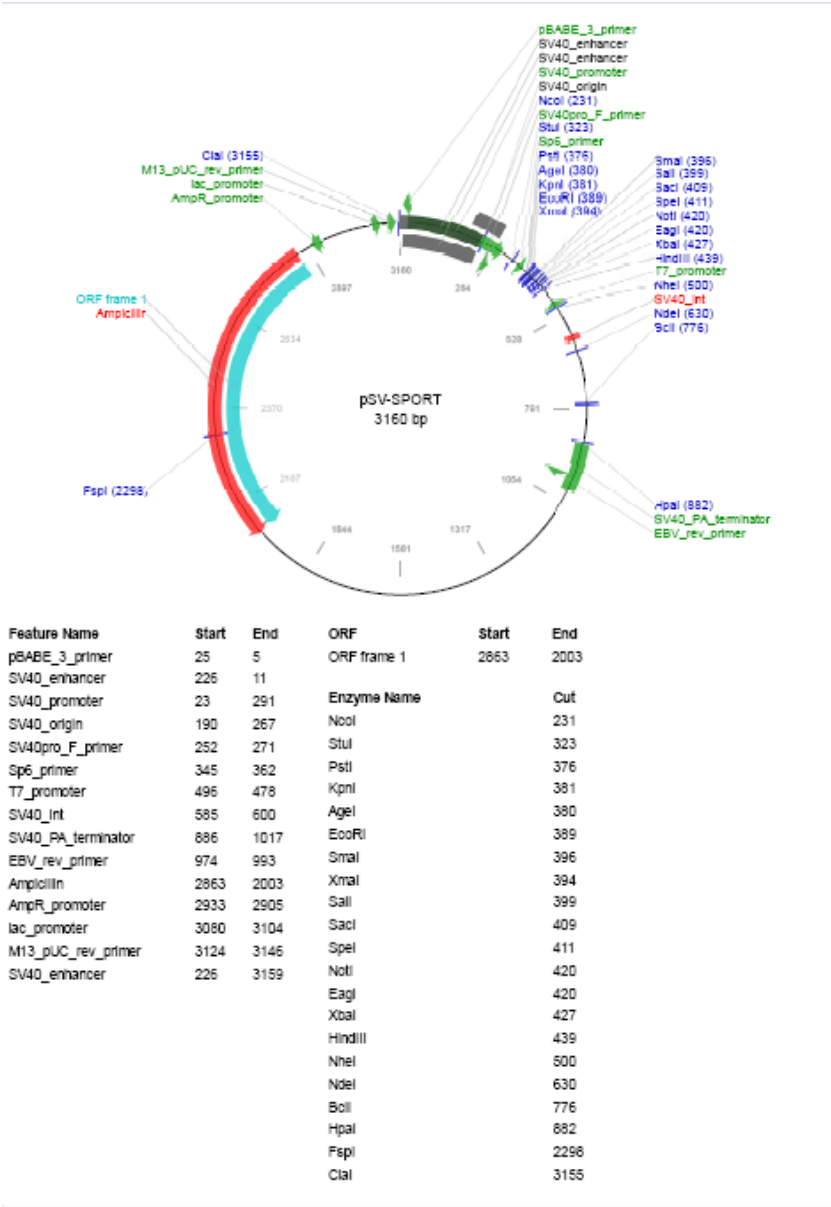
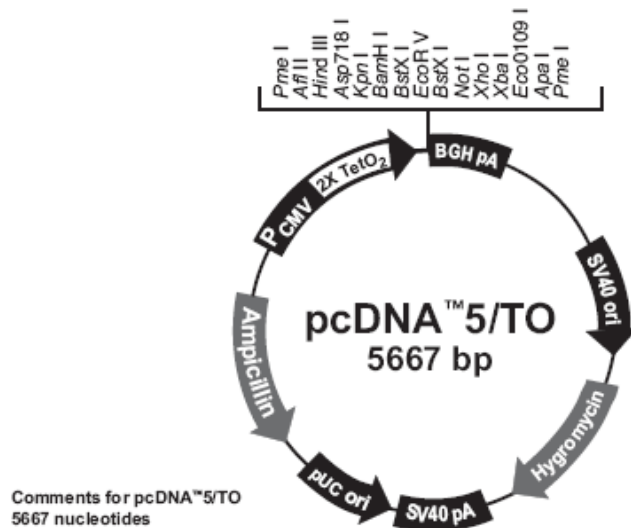


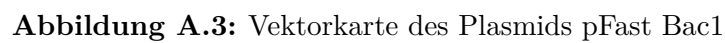
Abbildung A.1: Vektorkarte des Plasmids pSV- Sport



Comments for pcDNA™ 5/TO
5667 nucleotides

CMV promoter: bases 232-958
TATA box: bases 804-810
Tetracycline operator (2X TetO₂) sequences: bases 820-859
CMV forward priming site: bases 769-789
Multiple cloning site: bases 968-1077
BGH reverse priming site: bases 1089-1106
BGH polyadenylation sequence: bases 1095-1319
SV40 promoter and origin: bases 1820-2128
Hygromycin resistance gene: bases 2185-3210
SV40 early polyadenylation sequence: bases 3340-3470
pUC origin: bases 3853-4526 (complementary strand)
bla promoter: bases 5532-5630 (complementary strand)
Ampicillin (bla) resistance gene: bases 4671-5531 (complementary strand)

Abbildung A.2: Vektorkarte des Plasmids pc DNA- 5/TO



A.2 Schematische Darstellung des Bac-to-Bac-Expressionssystems

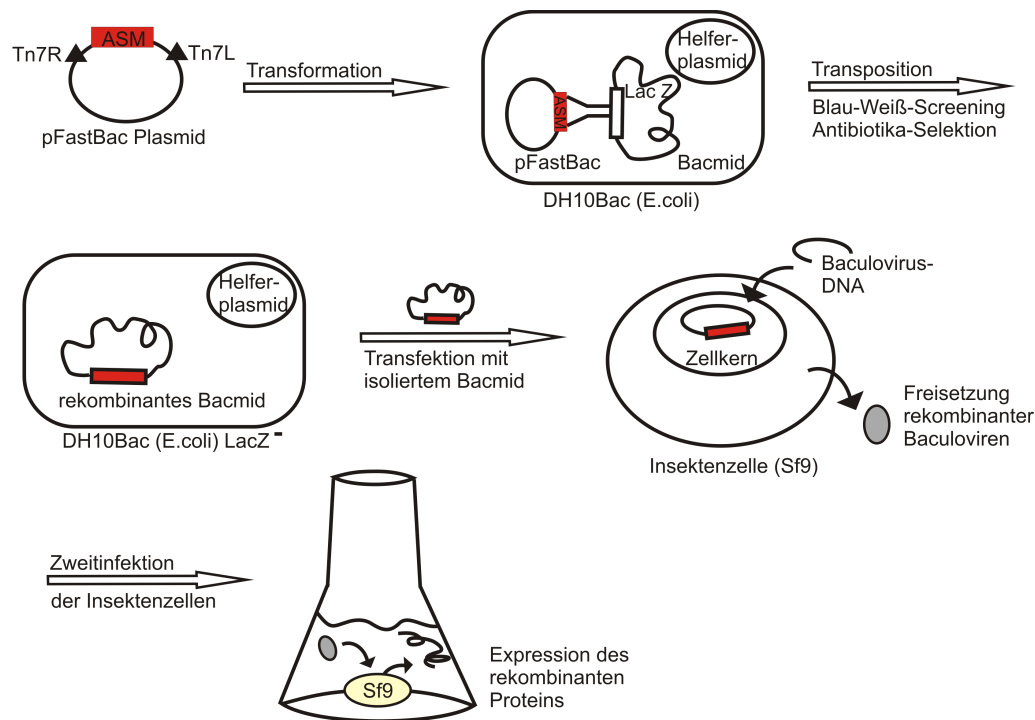


Abbildung A.4: Schematische Darstellung des Bac-to-Bac-Expressionssystems, modifiziert nach dem bac to bac manual, Invitrogen.

A.3 Chromatogramme der einzelnen Proteinreinigungsstufen

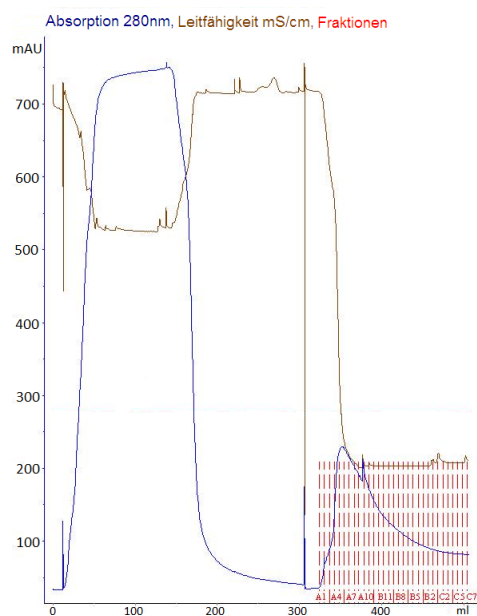


Abbildung A.5: Concanavalin A Sepharose Chromatographie ASM: gesamter Lauf

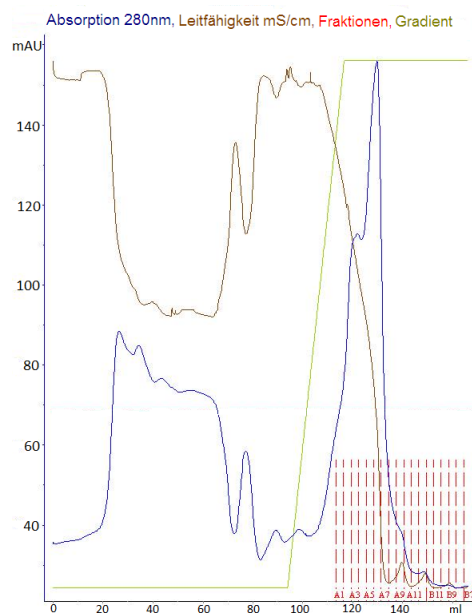


Abbildung A.6: Butyl-S Sepharose Chromatographie ASM: gesamter Lauf

A.3 Chromatogramme der einzelnen Proteinreinigungsstufen

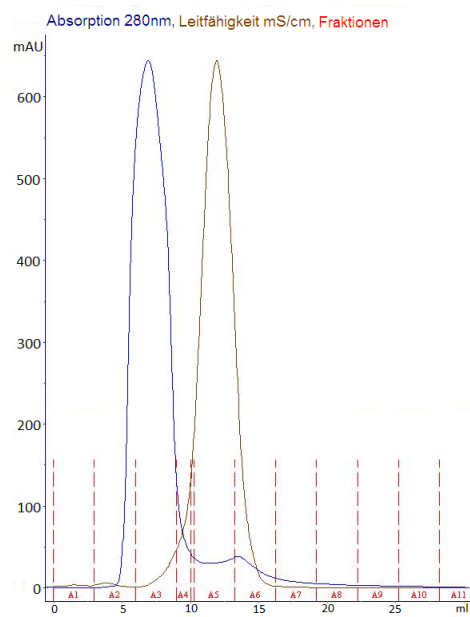


Abbildung A.7: Desalting Chromatographie ASM: gesamter Lauf

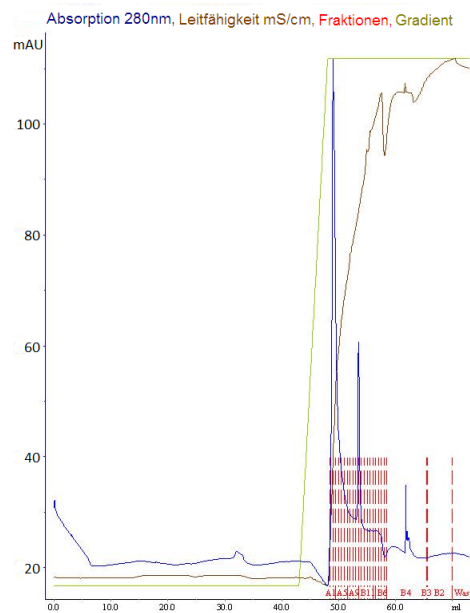


Abbildung A.8: Mono Q Chromatographie ASM: gesamter Lauf

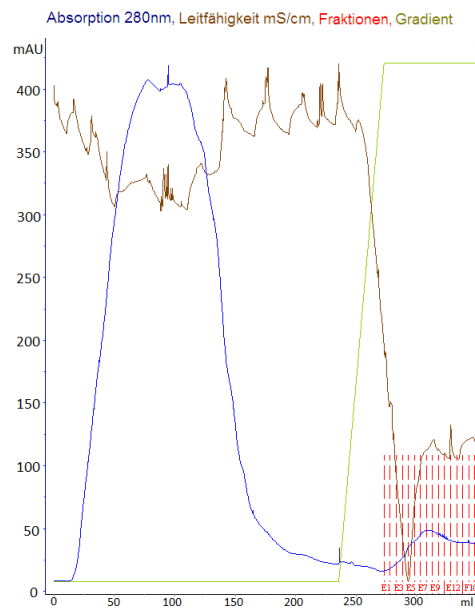


Abbildung A.9: Concanavalin A Sepharose Chromatographie ASAH

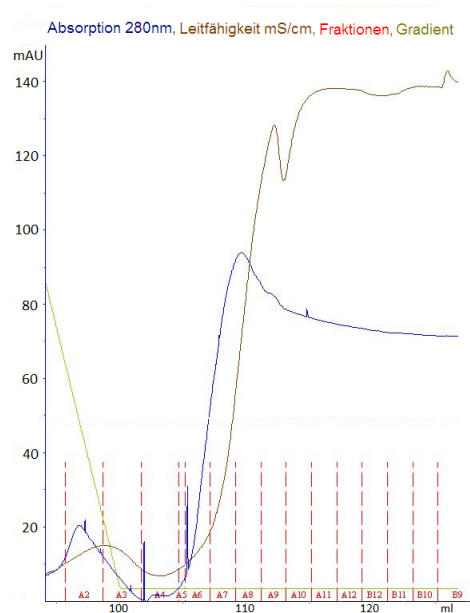


Abbildung A.10: QXL Sepharose Chromatographie NSM

A.4 Spektren der thermischen IR-Messungen

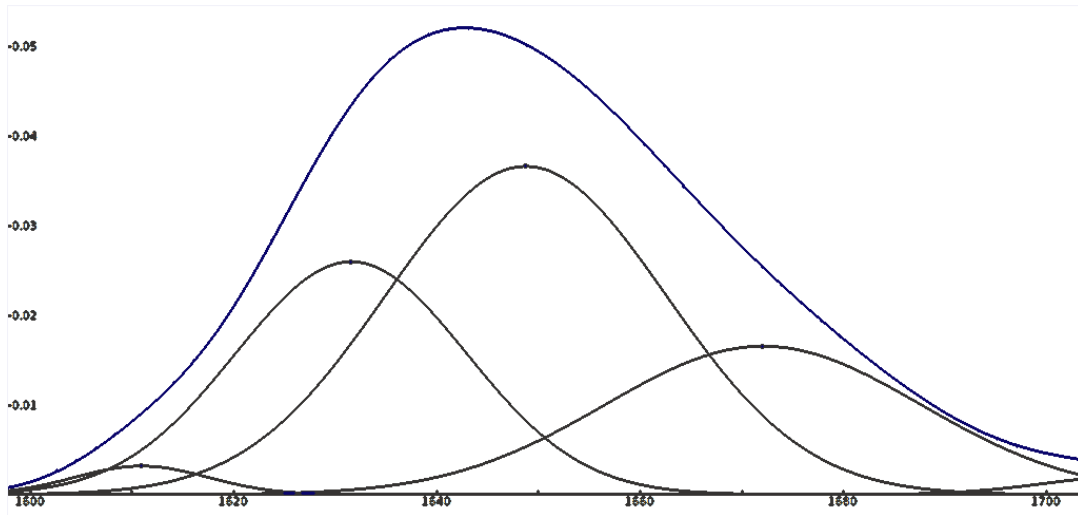


Abbildung A.11: FTIR-Spektrum Analyse der Amid I Bande WT-ASM: SVD-Zerlegung und Gauss-Fit-Analyse der thermischen IR-Messung 37 °C.

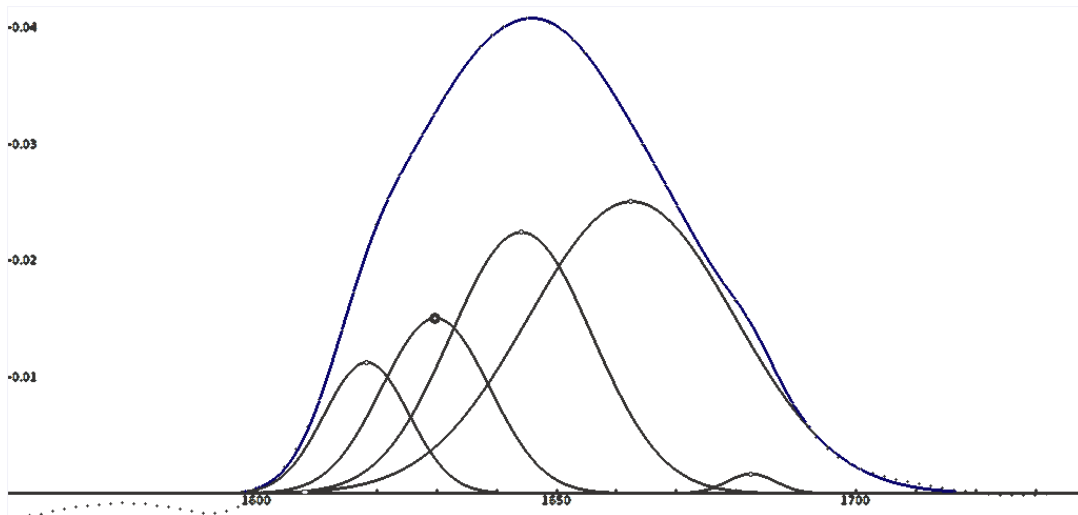


Abbildung A.12: FTIR-Spektrum Analyse der Amid I Bande WT-ASM: SVD-Zerlegung und Gauss-Fit-Analyse der thermischen IR-Messung 88 °C.

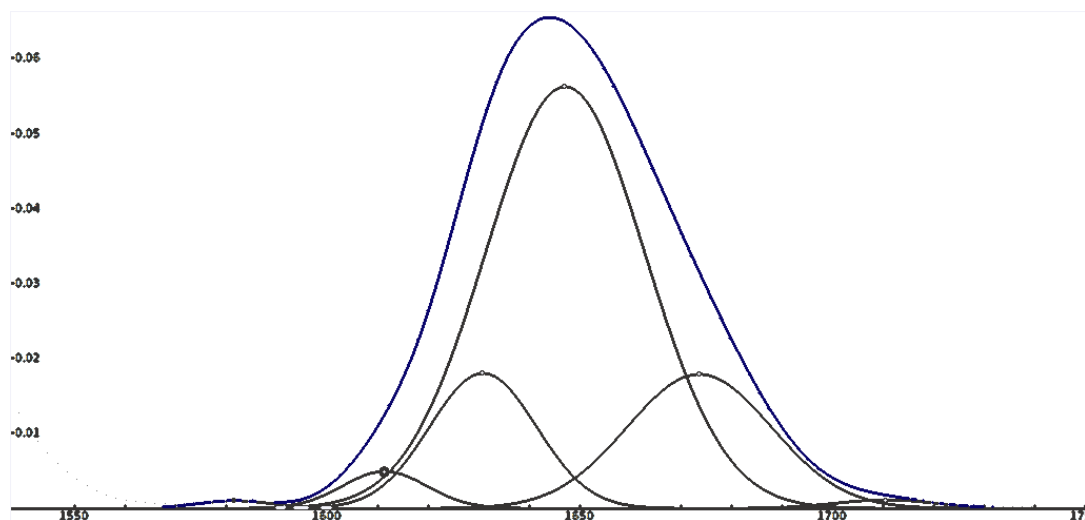


Abbildung A.13: FTIR- Spektrum Analyse der Amid I Bande ASM- R289H: SVD-Zerlegung und Gauss- Fit- Analyse der thermischen IR- Messung 37 °C.

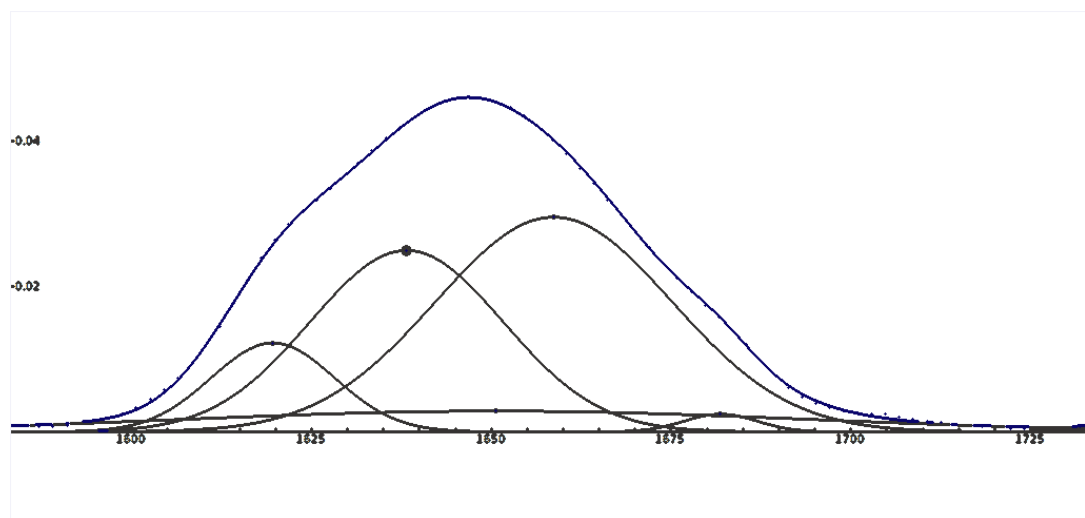


Abbildung A.14: FTIR-Spektrum Analyse der Amid I Bande ASM-R289H: SVD-Zerlegung und Gauss-Fit-Analyse der thermischen IR-Messung 88 °C.

Literatur

- [1] B. K. Gillard, L. T. Thurmon, *Glycobiology* **1993**, 3 (1), 57–67.
- [2] K. Simons, E. Ikonen, *Nature* **1997**, 387 (6633), 569–572.
- [3] R. G. Anderson, *Annu Rev Biochem* **1998**, 67, 199–225.
- [4] L. R. Ballou, S. J. F. Laulderkind, E. F. Rosloniec, R. Raghow, *Biochim. Biophys. Acta* **1996**, 1301, 273–287.
- [5] G. van Echten-Deckert, K. Sandhoff, *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 5341–5344.
- [6] E. C. Mandon, I. Ehse, J. Rother, G. van Echten-Deckert, K. Sandhoff, *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 11144–11148.
- [7] C. Michel, G. van Echten-Deckert, *FEBS Letters* **1997**, 416, 153–155.
- [8] P. E. Braun, E. E. Snell, *J. Biol. Chem.* **1968**, 243, 3775–3783.
- [9] W. Stoffel, D. LeKim, G. Sticht, *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* **1968**, 349, 664–670.
- [10] E. C. Mandon, G. van Echten-Deckert, R. Birk, R. R. Schmidt, K. Sandhoff, *Eur. J. Biochem.* **1991**, 198, 667–674.
- [11] J. Rother, G. van Echten-Deckert, G. Schwarzmair, K. Sandhoff, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1992**, 189, 14–20.
- [12] A. H. Merrill Jr., E. Wang, *J. Biol. Chem.* **1986**, 261, 3764–3769.
- [13] C. Michel, G. van Echten-Deckert, J. Rother, K. Sandhoff, E. Wang, A. H. Merrill, Jr., *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 22432–22437.
- [14] L. Geeraert, G. P. Mannaerts, P. P. van Veldhoven, *Biochem. J.* **1997**, 327, 125–132.
- [15] T. Mikami, M. Kashiwagi, K. Tsuchihashi, T. Akino, S. Gasa, *J. Biochem.* **1998**, 123, 906–911.

- [16] B. G. Kearns, T. P. McGee, P. Mayinger, A. Gedvilaite, S. E. Phillips, S. Kagiwada, V. A. Bankaitis, *Nature* **1997**, *387*, 101–105.
- [17] H. Coste, M.-B. Martel, R. Got, *Biochim. Biophys. Acta* **1986**, *858*, 6–12.
- [18] D. Jeckel, A. Karrenbauer, K. N. J. Burger, G. van Meer, F. Wieland, *J. Cell Biol.* **1992**, *117*, 259–267.
- [19] H. Lannert, C. Buening, D. Jeckel, F. T. Wieland, *FEBS Letters* **1994**, *342*, 91–96.
- [20] A. K. Menon, *Trends Cell. Biol* **1995**, *5*, 355–360.
- [21] H. Lannert, K. Gorgas, I. Meiûner, F. T. Wieland, D. Jeckel, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 2939–2946.
- [22] A. H. Futerman, B. Stieger, A. L. Hubbard, R. E. Pagano, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 8650–8657.
- [23] M. J. M. Obradors, D. Sillence, S. Howitt, D. Allan, *Biochim. Biophys. Acta* **1997**, *1359*, 1–12.
- [24] A. H. Merrill, Jr., D. W. Nixon, R. D. Williams, *J. Lipid Res* **1985**, *26*, 617–622.
- [25] A. Horvath, C. Sütterlin, U. Manning-Krieg, N. R. Movva, H. Riezmann, *EMBO J.* **1994**, *13*, 3687–3695.
- [26] K. Sandhoff, T. Kolter, *Naturwissenschaften* **1995**, *82*, 403–413.
- [27] K. Sandhoff, *Angew. Chem.* **1977**, *89*, 283–295.
- [28] G. W. Griffiths, B. Hoflack, K. Simons, I. S. Mellman, S. Kornfeld, *Cell* **1988**, *52*, 329–341.
- [29] W. Fürst, K. Sandhoff, *Biochim. Biophys. Acta* **1992**, *1126*, 1–16.
- [30] K. Sandhoff, K. Harzer, W. Fürst, *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* **1995**, 2427–2441.
- [31] T. Kolter, K. Sandhoff, *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **2005**, *21*, 81.
- [32] M. W. Spence, *Adv. Lipid Res.* **1993**, *26*, 3–23.
- [33] D. F. Hassler, R. M. Bell, *Adv. Lipid Res.* **1993**, *26*, 49–58.

-
- [34] S. M. Bajjalieh, T. F. J. Martin, E. J. Floor, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 14354–14360.
- [35] L. Riboni, P. Viani, R. Bassi, A. Prinetti, G. Tettamanti, *Prog. Lipid Res.* **1997**, *36*, 153–195.
- [36] B. M. Buehrer, R. M. Bell, *Adv. Lipid Res.* **1993**, *26*, 59–67.
- [37] A. Olivera, T. Kohama, Z. Tu, S. Milstien, S. Spiegel, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 12576–12583.
- [38] P. P. van Veldhoven, G. P. Mannaerts, *Adv. Lipid Res.* **1993**, *26*, 69–98.
- [39] A. E. Garrod, *Inborn Errors of Metabolism* **1923**.
- [40] H. G. Hers, *Gastroenterology* **1966**, *48*, 625–633.
- [41] R. L. Pisoni, J. G. Thoene, *Biochim. Biophys. Acta* **1991**, *1071*, 351–373.
- [42] K. Suzuki, *Basic Neurochemistry: Molecular Cellular and Medical Aspects* **1994**, 93–812.
- [43] T. Kolter, K. Sandhoff, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 1632–1670.
- [44] P. W. Janes, S. C. Ley, A. I. Magee, P. S. Kabouridis, *Semin. Immunol.* **2000**, *12*, 23–34.
- [45] L. J. Pike, J. M. Miller, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 22298–22304.
- [46] P. S. Liu, Y. S. Ying, Y. G. Ko, R. W. Anderson, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 10299–10303.
- [47] P. W. Janes, S. C. Ley, A. I. Magee, *J. Cell Biol.* **1999**, *147*, 447–461.
- [48] R. F. Zwaal, A. J. Schroit, *Blood* **1997**, *89*, 1121–1132.
- [49] M. Chatelut, M. Leruth, K. Harzer, A. Dagan, S. Marchesini, S. Gatt, R. Salvayre, P. Courtoy, T. Levade, *FEBS Letters* **1998**, *426*, 102–106.
- [50] H. Grassme, A. Jekle, A. Riehle, H. Schwarz, J. Berger, K. Sandhoff, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 20589–20596.
- [51] A. D. Tepper, P. Ruurs, T. Wiedmer, P. J. Sims, J. Borst, W. J. van Blitterswijk, *J. Cell. Biol.* **2000**, *150*, 155–164.
- [52] B.S. Robinson, C.S.T. Hii, A. Poulos, A. Ferrante, *Immunology* **1997**, *91*, 274–280.

- [53] Y. A. Hannun, *Science* **1996**, *274*, 1855–1859.
- [54] C. G. Simon, P. W. Holloway, A. R. Gear, *Biochemistry* **1999**, *38*, 14676–14682.
- [55] R. N. Kolesnick, F. M. Goni, A. Alonso, *J. Cell. Physiol.* **2000**, *184*, 285–300.
- [56] A. H. J. Merrill, E.- M. Schmelz, D. L. Dillehay, S. Spiegel, J. A. Shayman, J. J. Schroeder, R.T. Riley, K. A. Voss, E. Wang, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1997**, *142*, 208–225.
- [57] Y. A. Hannun, C. Luberto, *Trends Cell Biol.* **2000**, *10*, 73–80.
- [58] D. K. Perry, *Biochem. Soc. Trans* **1999**, *27*, 399–404.
- [59] S. Mathias, L. A. Pena, R. N. Kolesnick, *Biochem. J.* **1998**, *335*, 465–480.
- [60] K. Kirtikara, S. J. Lauderkind, R. Raghow, T. Kanekura, L. R. Ballou, *Mol. Cell. Biochem.* **1998**, *181*, 41–48.
- [61] S. Jayadev, H. L. Hayter, N. Andrieu, C. J. Gamard, B. Liu, R. Balu, M. Hayakawa, F. Ito, Y. A. Hannun, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 17196–17203.
- [62] C. E. Chalfant, K. Kishikawa, A. Bielawska, Y. A. Hannun, *Methods Enzymol.* **2000**, *312*, 420–428.
- [63] C. E. Chalfant, K. Kishikawa, M. C. Mumby, C. Kamibayashi, A. Bielawska, Y. A. Hannun, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 20313–20317.
- [64] Y. H. Zhang, B. Yao, S. Delikat, S. Bayoumy, X. H. Lin, S. Basu, M. McGinley, P. Y. Chan-Hui, H. Lichenstein, R. N. Kolesnick, *Cell* **1997**, *89*, 63–72.
- [65] W. Yu, W. J. Fantl, G. Harrowe, L. T. Williams, *Curr. Biol.* **1998**, *8*, 56–64.
- [66] M. Heinrich, M. Wickel, S. Winoto-Morbach, W. Schneider- Brachert, T. Weber, J. Brunner, P., Saftig, C. Peters, M. Kronke, S. Schutze, *Adv. Exp. Med. Biol* **2000**, *477*, 305–315.
- [67] M. Heinrich, M. Wickel, W. Schneider-Brachert, C. Sandberg, J. Gahr, R. Schwandner, T. Weber, P. Saftig, C. Peters, J. Brunner, M. Kronke, S. Schutze, *EMBO J.* **1999**, *18*, 5252–5263.
- [68] Y. A. Hannun, C. R. Loomis, A. H. Jr. Merrill, R. M. Bell, *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 12604–12609.

-
- [69] Y. Lavie, O. Piterman, M. Liscovitch, *FEBS Letters* **1990**, *277*, 7–10.
- [70] V. Natarajan, H. N. Jayaram, W. M. Scribner, J. G. Garcia, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **1994**, *11*, 221–229.
- [71] K. Yamada, F. Sakane, *Biochim. Biophys. Acta* **1993**, *1169*, 211–216.
- [72] M. J. Lee, J. R. Van Brocklyn, S. Thangada, C. H. Liu, A. R. Hand, R. Menzeleev, S. Spiegel, T. Hla, *Science* **1998**, *279*, 1552–1554.
- [73] S. An, T. Bleu, W. Huang, O. G. Hallmark, S. R. Coughlin, E. J. Goetzl, *FEBS Letters* **1997**, *417*, 279–282.
- [74] G. Zhang, J. J. Contos, J. A. Weiner, N. Fukushima, J. Chun, *Gene* **1999**, *227*, 89–99.
- [75] H. Zhang, N. N. Desai, A. Olivera, T. Seki, G. Brooker, S. Spiegel, *J. Cell Biol* **1991**, *114*, 155–167.
- [76] Q. Zhang, O. Peyruchaud, K. J. French, M. K. Magnusson, D. F. Mosher, *Blood* **1999**, *93*, 2984–2990.
- [77] M. J. Lee, S. Thangada, K. P. Claffey, N. Ancellin, C. H. Liu, M. Kluk, M. Volpi, R. I. Sha’afi, T. Hla, *Cell* **1999**, *99*, 301–312.
- [78] O. Cuvillier, G. Pirianov, B. Kleuser, P. G. Vanek, O. A. Coso, J. S. Gutkind, S. Spiegel, *Nature* **1996**, *381*, 800–803.
- [79] T. K. Ghosh, J. Bian, D. L. Gill, *Science* **1990**, *248*, 1653–1656.
- [80] T. K. Ghosh, J. Bian, D. L. Gill, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 22628–22635.
- [81] O. Cuvillier, D. S. Rosenthal, M. E. Smulson, S. Spiegel, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 2910–2916.
- [82] A. H. Erickson, G. E. Conner, G. Blobel, *J. Biol. Chem.* **1981**, *256*, 11224–11231.
- [83] A. H. Erickson, P. Walter, G. Blobel, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1983**, *115*, 275–280.
- [84] M. G. Rosenfeld, G. Kreibich, D. Popov, K. Kato, D. D. Sabatini, *J. Cell Biol.* **1982**, *93*, 135–143.
- [85] R. Kornfeld, S. Kornfeld, *Annu. Rev. Biochem.* **1985**, *54*, 631–664.

- [86] A. Hasilik, K. von Figura, *In Lysosomes in Biology and Pathology* **1984**, Elsevier Science Publishers, New York, 3–16.
- [87] A. Kaplan, D. T. Achord, W. S. Sly, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **1977**, 74, 2026–2030.
- [88] A. Gonzalez-Noriega, J. H. Grubb, V. Talkad, W. S. Sly, *J. Cell Biol.* **1980**, 85, 839–852.
- [89] M. C. Willingham, I. H. Pastan, G. G. Sahagian, G. W. Jourdian, E. F. Neufeld, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **1981**, 78, 6967–6971.
- [90] V. Gieselmann, R. Pohlmann, A. Hasilik, K. von Figura, *J. Cell Biol.* **1983**, 97, 1–5.
- [91] A. Roitman, S. Gatt, *Isr. J. Chem.* **1963**, 1, 190.
- [92] S. Yamaguchi, K. Suzuki, *J. Biol. Chem.* **1977**, 252, 3805–3813.
- [93] T. Yamanaka, E. Hanada, K. Suzuki, *J. Biol. Chem.* **1981**, 256, 3884–3889.
- [94] T. Yamanaka, K. Suzuki, *J. Neurochem.* **1982**, 38, 1753–1764.
- [95] P. G. Pentchev, R. O. Brady, A. E. Gal, S. R. Hibbert, *Biochim. Biophys. Acta* **1977**, 488, 312–321.
- [96] J. Kurth, W. Stoffel, *Biol. Chem. Hoppe Seyler* **1991**, 372, 215–223.
- [97] C. S. Jones, P. Shankaran, J. W. Callahan, *Biochem. J.* **1981**, 195, 373–382.
- [98] N. Sakuragawa, *J. Biochem. (Tokyo)* **1982**, 92, 637–646.
- [99] K. Watanabe, N. Sakuragawa, M. Arima, E. Satoyoshi, *J. Lipid. Res.* **1983**, 24, 596–603.
- [100] D. Samet, Y. Barenholz, *Chem. Phys. Lipids* **1999**, 102, 65–77.
- [101] L. E. Quintern, G. Weitz, K. Sandhoff, *Biochim. Biophys. Acta* **1987**, 922, 323–336.
- [102] O. Bartelsen, S. Lansmann, M. Nettersheim, T. Lemm, K. Ferlinz, K. Sandhoff, *Journal of Biotechnology* **1998**, 63, 29–40.
- [103] X. He, S. R. P. Miranda, X. Xiong, A. Dagan, S. Gatt, E. H. Schuchman, *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, 1432, 251–264.

-
- [104] L. da Veiga Pereira, R. J. Desnick, D. A. Adler, C. M. Disteché, E. H. Schuchman, *Genomics* **1991**, *9*, 229–234.
- [105] E. H. Schuchman, O. Levran, L. da Veiga Pereira, R. J. Desnick, *Genomics* **1992**, *12*, 197–205.
- [106] E. H. Schuchman, M. Suchi, T. Takahashi, K. Sandhoff, R. J. Desnick, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 8531–8539.
- [107] R. Hurwitz, K. Ferlinz, C. Vielhaber, H. Moczall, K. Sandhoff, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 5440–5445.
- [108] R. Hurwitz, K. Ferlinz, K. Sandhoff, *Biol. Chem. Hoppe Seyler* **1994**, *375* (7), 447.
- [109] S. L. Schissel, G. A. Keesler, E. H. Schuchman, K. J. Williams, I. Tabas, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 18250–18259.
- [110] K. Ferlinz, R. Hurwitz, G. Vielhaber, K. Suzuki, K. Sandhoff, *Biochem. J.* **1994**, *301*, 855–862.
- [111] R. W. Jenkins, J. Idkowiak-Baldys, F. Simbari, D. Canals, P. Roddy, C. D. Riner, C. J. Clarke, Y. A. Hannun, *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 3777–3788.
- [112] K. Ferlinz, R. Hurwitz, H. Moczall, S. Lansmann, E. A. Schuchman, K. Sandhoff, *Eur. J. Biochem.* **1997**, *243*, 511–517.
- [113] S. Lansmann, C. G. Schuette, O. Bartelsen, J. Hoernschemeyer, T. Linke, J. Weisgerber, K. Sandhoff, *Eur. J. Biochem.* **2003**, *270*, 1076–1088.
- [114] B. Liu, Y. A. Hannun, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 16281–16287.
- [115] H. Qiu, T. Edmunds, J. Baker-Malcolm, K. P. Karey, S. Estes, C. Schwarz, H. Hughes, S. M. Van Patten, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278* (35), 32744–32752.
- [116] Y. H. Zeidan, *FASEB J.* **2008**, *22* (1), 183.
- [117] Y. H. Zeidan, R. W. Jenkins, Y. A. Hannun, *J. Cell. Biol.* **2008**, *181* (2), 335.
- [118] Y. H. Zeidan, Y. A. Hannun, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282* (15), 11549.
- [119] B. G. Rao, M. W. Spence, *J. Lipid Res.* **1976**, *17*, 506–515.
- [120] K. Y. Hostetler, P. J. Yazaki, *J. Lipid Res.* **1979**, *20*, 456–463.

- [121] C. P. Ponting, *Protein Science* **1994**, *3*, 359–361.
- [122] H. Christomanou, A. Aignesberger, R. P. Linke, *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **1986**, *367*, 879–890.
- [123] S. C. Li, S. Sonnino, G. Tettamanti, Y. T. Li, *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 6588–6591.
- [124] S. Morimoto, B. M. Martin, Y. Kishimoto, J. S. O'Brien, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1988**, *156*, 403–410.
- [125] M. Seto, M. Whitlow, M. A. McCarrick, S. Srinivasan, Y. Zhu, R. Pagila, R. Mintzer, D. Light, A. Johns, J. A. Meurer-Ogden, *Protein Science* **2004**, *13*, 3172–3186.
- [126] V. O. Oninla, B. Breiden, J. O. Babalola, K. Sandhoff, *Journal of Lipid Research* **2014**, *55*, 2606–2619.
- [127] F.D. Testai, et al., *J. Neurochem.* **2004**, *89* (3), 636.
- [128] M. Kolzer, et al., *Biol. Chem.* **2003**, *384* (9), 1293.
- [129] A. G. Roth, D. Drescher, Y. Yang, S. Redmer, S. Uhlig, C. Arenz, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 7697–7700.
- [130] S. Albouz , F. Le Saux, D. Wenger, J. J. Hauw, N. Baumann, *Life Sci.* **1986**, *38*, 357–363.
- [131] M. Kölzer, N. Werth, K. Sandhoff, *FEBS Letters* **2004**, *559*, 96–98.
- [132] S. Elojeimy, D. H. Holman, X. Liu, A. El-Zawahry, M. Villani, J. C. Cheng, A. Mahdy, Y. Zeidan, A. Bielwaska, Y. A. Hannun, J. S. Norris, *FEBS Letters* **2006**, *580*, 4751–4756.
- [133] M. W. Spence, J. W. Callahan, *The Metabolic Basis of Inherited Disease* **1989**, *8*, 1655–1676.
- [134] A. Niemann, *Jahrbuch Kinderheilkunde* **1914**, *79*, 1.
- [135] L. Pick, *Med. Klin.* **1927**, *23*, 1483.
- [136] E. Klenk, *Z. Physiol. Chem.* **1934**, *229*, 151.
- [137] R. O. Brady, J. N. Kanfer, M. B. Mock, D. S. Fredrickson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1966**, *55*, 366.

-
- [138] P. B. Schneider, E. P. Kennedy, *J. Lipid. Res.* **1967**, *8*, 202.
- [139] D. Graber, R. Salvayre, T. Levade, *Journal of Neurochemistry* **1994**, *63* (3), 1060–1068.
- [140] T. Takehashi, M. Suchi, R. J. Desnick, G. Takada, E. H. Schuchman, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 1187–1191.
- [141] J. Q. Fan, *TRENDS in Pharmacological Sciences* **2003**, *24*, 355–360.
- [142] S. W. Gerstin, M. Staudigl, M. S. Truger, D. D. Messing, M. K. Danecka, C. P. Sommerhoff, K. F. Kempter, A. C. Muntau, *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 30686–30697.
- [143] A. L. Pey, M. Ying, N. Cremades, A. Velazquez- Campoy, T. Scherer, B. Thöny, J. Sancho, A. Martinez, *J. Clin. Invest.* **2008**, *118*, 2858–2867.
- [144] *Pat.*, WO 2005/ 051331 A2, **2005**.
- [145] I. Jones, X. He, F. Katouzian, P. I. Darroch, E. H. Schuchman, *Molecular Genetics and Metabolism* **2008**, *95*, 152–162.
- [146] P. G. Pentchev, R. O. Brady, E. J. Blanchette-Mackie, M. T. Vanier, E. D. Carstea, C. C. Parker, E. Goldin, C.F. Roff, *Biochim. Biophys. Acta* **1994**, *1225*, 235–243.
- [147] H. Schulze, K. Sandhoff, *Lysosomal Lipid Storage Diseases*, (Hrsg.: K. Simons), Cold Spring Harbor Laboratory Press, **2011**.
- [148] S. Tomiuk, K. Hofmann, M. Nix, M. Zumbansen, W. Stoffel, *Proc. Nat Acad. Sci. USA.* **1998**, *95*, 3638–3643.
- [149] H. Sawai, N. Domae, N. Nagan, Y. A. Hannun, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 38131–38139.
- [150] K. Hofmann, S. Tomiuk, M. Nix, M. Zumbansen, W. Stoffel, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **2000**, *97*, 5895–5900.
- [151] M. Tani, Y. A. Hannun, *J Biol Chem.* **2007**, *282* (13), 10047–10056.
- [152] M. Tani, Y. A. Hannun, *FEBS Letters* **2007**, *581* (7), 1323–1328.
- [153] C. J. Clarke, C. F. Snook, M. Tani, N. Matmati, N. Marchesini, Y. A. Hannun, *Biochemistry* **2006**, *45* (38), 11247–11256.

- [154] O. Krut, K. Wiegmann H. Kashkar, B. Yazdanpanah, M. Kronke, *J Biol Chem.* **2006**, *281* (19), 13784–13793.
- [155] B. X. Wu, V. Rajagopalan, P. L. Roddy, C. J. Clarke, Y. A. Hannun, *J. Biol. Chem.* **2010**, *285* (23), 17993–18002.
- [156] L. Nyberg, R. D. Duan, J. Axelson, A. Nilsson, *Biochim. Biophys. Acta* **1996**, *1300*, 42–48.
- [157] R.-D. Duan, Y. Cheng, G. Hansen, E. Hertervig, J.-J. Liu, I. Syk, H. Sjöström, Å. Nilsson, *Journal of Lipid Research* **2003**, *44*, 1241–1250.
- [158] X. He, N. Okino, R. Dhami, A. Dagan, S. Gatt, H. Schulze, K. Sandhoff, E. H. Schuchman, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 32978–32986.
- [159] S. Gatt, *J. Biol. Chem.* **1963**, *238*, 3131–3133.
- [160] K. Bernardo, R. Hurwitz, T. Zenk, R.J. Desnick, K. Ferlinz, E. H. Schuchman, K. Sandhoff, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 11098–11102.
- [161] J. Koch, S. Gartner, C. M. Li, L. E. Quintern, K. Bernardo, O. Levran, D. Schnabel, R. J. Desnick, E. H. Schuchman, K. Sandhoff, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 33110–33115.
- [162] K. Ferlinz, G. Kopal, K. Bernardo, T. Linke, J. Bar, B. Breiden, U. Neumann, F. Lang, E. H. Schuchman, K. Sandhoff, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 35352–35360.
- [163] K. Bernardo, R. Hurwitz, T. Zenk, R. J. Desnick, K. Ferlinz, E. H. Schuchman, K. Sandhoff, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 1098–11102.
- [164] A. Klein, M. Henseler, C. Klein, K. Suzuki, K. Harzer, K. Sandhoff, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1994**, *200*, 1440–1448.
- [165] N. Azuma, J. S. O'Brien, H. W. Moser, Y. Kishimoto, *Arch. Biochem. Biophys.* **1994**, *311*, 354–357.
- [166] S. Farber, J. Cohen, L. L. Uzman, *J. Mt. Sinai Hosp. N.Y.* **1957**, *24*, 816–837.
- [167] M. Sugita, J.T. Dulaney, H.W. Moser, *Science* **1972**, *178*, 1100–1102.
- [168] S. Lansmann, O. Bartelsen, K. Sandhoff, *Methods Enzymol.* **2000**, *311*, 149–156.

-
- [169] S. Kubick, M. Gerrits, H. Merk, W. Stiege, V. A. Erdmann, *Current Topics in Membranes* **2009**, *63*, 25–49.
- [170] H. Schulze, U. Schepers, K. Sandhoff, *Biol. Chem.* **2007**, *388*, 1333–1343.
- [171] U. Matzner, B. Breiden, G. Schwarzmann, K. Sandhoff, *J. Biol. Chem.* **2009**, *284* (14), 9372–9381.
- [172] K. P. Bhabak, A. Hauser, S. Redmer, S. Banhart, D. Heuer, C. Arenz, *ChemBioChem* **2013**, *14*, 1049–1052.
- [173] K. P. Bhabak, D. Proksch, S. Redmer, C. Arenz, *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 6162–6170.
- [174] S. Krimm, J. Bandekar, *Adv. Prot. Chem.* **1986**, *38*, 181–3464.
- [175] T. Linke, G. Wilkening, S. Lansmann, H. Moczall, O. Bartelsen, J. Weisgerber, K. Sandhoff, *Biol. Chem.* **2001**, *382*, 283–290.
- [176] T. Kirkegaard, A. G. Roth, N. H. T. Petersen, A. K. Mahalka, O. Dines Olsen, I. Moilanen, A. Zylicz, J. Knudsen, K. Sandhoff, C. Arenz, P. K. J. Kinnunen, J. Nylandsted, M. Jäättelä, *Nature* **2010**, *463*, 549–554.
- [177] J. Nylandsted, et al., *J. Exp. Med.* **2004**, *200*, 425–435.
- [178] I. Horváth, L. Vigh, *Nature* **2010**, *463*, 436–438.
- [179] M. S. Ostefeld, N. Fehrenbacher, M. Høyer-Hansen, C. Thomsen, T. Farkas, M. Jäättelä, *Cancer Res.* **2005**, *65*, 8975–8983.
- [180] N. H. T. Petersen, O. D. Olsen, L. Groth-Pedersen, A. Ellegaard, M. Bilgin, S. Redmer, M. S. Ostefeld, D. Ulanet, T. H. Dovmark, A. Lønborg, S. D. Vindeløv, D. Hanahan, C. Arenz, C. S. Ejlsing, T. Kirkegaard, M. Rohde, J. Nylandsted, M. Jäättelä, *Cancer Cell* **2013**, *24*, 1–15.
- [181] R. C. MacDonald, R. I. MacDonald, B. P. Menco, K. Takeshita, N. K. Subbarao, L. R. Hu, *Biochim. Biophys. Acta* **1991**, *1061*, 297–303.
- [182] U. K. Laemmli, *Nature* **1970**, *227*, 680–685.
- [183] P. Matsudaira, *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 10035–10038.
- [184] P.K. Smith, R.I. Krohn, G.T. Hermanson, A.K. Mallia, F.H. Gartner, M.D. Provenzano, E.K. Fujimoto, N.M. Goeke, B.J. Olson, D.C. Klenk, *Anal. Biochem.* **1985**, *150*, 76–85.

- [185] O. P. van Diggelen, YA. V. Voznyi, J. L. M. Keulemans, K. Schoonderwoerd, J. Ledvinova, E. Mengel, M. Zschiesche, R. Santer, K. Harzer, *J. Inherit. Metab. Dis.* **2005**, *28*, 733–741.

Danksagung

Zunächst möchte ich mich an dieser Stelle bei all denjenigen bedanken, die zum Erfolg und Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Daher gilt mein Dank in erster Linie Prof. Dr. Christoph Arenz, der mir mit dieser interessanten Themenstellung die Möglichkeit gab, fachübergreifend neue Techniken und Methoden zu erlernen und mein Wissen auf zahlreichen Kongressen zu erweitern. Der gesamten Arbeitsgruppe, insbesondere Saskia Neubacher, Marlen Hesse, Stephanie Diederich und Claudine Dojahn, danke ich für die schöne Arbeitsatmosphäre und die gute Zusammenarbeit und Unterstützung.

Ein besonderer Dank richtet sich an Dr. Bernadette Breiden und die Arbeitsgruppe Sandhoff für ihre Unterstützungen bei den liposomalen Assays und der Hilfestellung bei den Experimenten mit den (NPA -/-) Fibroblasten.

Danken möchte ich auch Dr. Eglof Ritter für die hervorragende und interessante Einweisung in die IR- Spektroskopie von Proteinen.

Der Arbeitsgruppe von Dr. Stefan Kubick möchte ich für den vermittelten Einblick in das Gebiet der zellfreien Expressionssysteme meinen Dank aussprechen.

Zu guter Letzt danke ich meinem Ehemann Simon Ficht für die liebevolle Unterstützung und die vielen gemeinsamen Besuche im Labor zur Aufrechterhaltung der Zellkultur an Wochenenden und Feiertagen.

Abbildungsverzeichnis

1.1	Biosynthese von Ceramid	4
1.2	Biosynthese von Sphingomyelin	5
1.3	Lysosomaler Katabolismus der Sphingolipide	7
1.4	Katabolismus der Sphingolipide	9
1.5	Biosynthese lysosomaler Enzyme	17
1.6	Domänenstruktur der ASM	21
1.7	Modell der ASM-Phosphodiesterase-Domäne	22
1.8	Modellstruktur der ASM	26
3.1	Elutionsprofil Concanavalin A Sepharose ASM	33
3.2	Elutionsprofil Butyl-S Sepharose ASM	34
3.3	Elutionsprofil Desalting Chromatographie ASM	35
3.4	Elutionsprofil Mono Q ASM	36
3.5	SDS-PAGE ASM	37
3.6	Western Blot ASM	38
3.7	Kinetische Auswertung nach Lineweaver-Burk und Hanes	40
3.8	Sphingomyelin-Umsatz im mizellaren Assay	42
3.9	Liposomaler Sphingomyelinase-Assay	43
3.10	Bestimmung der Sphingomyelinmenge in (NPA -/-) Fibroblastenzellen . . .	46
3.11	FT-IR-Spektrum Amid I Bande WT-ASM	50
3.12	FT-IR-Spektrum Amid I Bande ASM-R289H	51
3.13	FT-IR-Spektrum Amid I Bande ASM-H421Y	51
3.14	FT-IR-Spektrum Amid I Bande ASM-R496L	52
3.15	SPR-Messungen ASM	56
3.16	Auswertung SPR-Messungen ASM	57
3.17	Strukturen Desipramin und Siramesin	58
6.1	Erzeugung des Plasmids pFastBac-WTASM	72
6.2	Enzymatische Kontrollreaktion WT-ASM, pFastBac1 und pSV Sport	75

6.3	Enzymatische Kontrollreaktion ASAH und pFastBac1	79
6.4	Erhalt der Baculoviren: Virus-Urstock, erste bis dritte Schüttelamplifikation	81
6.5	Proteinreinigungsschema ASM	84
A.1	Vektorkarte des Plasmids pSV- Sport	110
A.2	Vektorkarte des Plasmids pc DNA- 5/TO	111
A.3	Vektorkarte des Plasmids pFast Bac1	112
A.4	Schematische Darstellung des Bac-to-Bac-Expressionssystems	113
A.5	Gesamtlauf Concanavalin A Sepharose ASM	114
A.6	Gesamtlauf Butyl- S Sepharose ASM	114
A.7	Gesamtlauf Desalting Chromatographie ASM	115
A.8	Gesamtlauf Mono Q ASM	115
A.9	Gesamtlauf Concanavalin A Sepharose ASAH	116
A.10	Gesamtlauf QXL Sepharose NSM	116
A.11	FTIR-Spektrum Analyse der Amid I Bande WT-ASM 37 °C	117
A.12	FTIR-Spektrum Analyse der Amid I Bande WT-ASM 88 °C	117
A.13	FTIR- Spektrum Analyse der Amid I Bande ASM- R289H 37 °C	118
A.14	FTIR-Spektrum Analyse der Amid I Bande ASM-R289H 88 °C	118

Tabellenverzeichnis

1.1	Übersicht der Sphingolipidosen	10
3.1	Kinetische Parameter nach Lineweaver-Burk und Hanes	40
3.2	Quantitative Bestimmung von Sekundärstrukturelementen WT-ASM	53
3.3	Quantitative Bestimmung von Sekundärstrukturelementen ASM-R289H . .	53
6.1	Enzymatische Spaltung der Plasmide pSVSport-WT ASM bzw. pFastBac1 mit Hind III	73
6.2	Enzymatische Spaltung der Plasmide pSVSport-WT ASM bzw. pFastBac1 mit Eco RI	74
6.3	Ligationsansatz WT-ASM und pFastBac1	74
6.4	Primer für die ortsspezifische Mutagenese	76
6.5	Reaktionsansatz für die ortsspezifische Mutagenese	76
6.6	Thermocyclerprogramm für die ortsspezifische Mutagenese	77
6.7	Enzymatische Spaltung des Plasmids pcDNA 5/TO-ASAH1 bzw. pFastBac1 mit Bam HI und Xho I	78
6.8	Ligationsansatz ASAH1 und pFastBac1	78
6.9	Puffer für die Concanavalin A Sepharose Chromatographie ASM	84
6.10	Puffer für die Butyl-S Sepharose Chromatographie ASM	85
6.11	Puffer für die Desalting Chromatographie ASM	86
6.12	Puffer für die Mono Q Sepharose Chromatographie ASM	87
6.13	Puffer für die Concanavalin A Sepharose Chromatographie ASAH	89
6.14	Puffer für die Homogenisation des Hirnpräparats	90
6.15	Puffer für die Anionenaustauschchromatographie an QXL-Sepharose NSM .	91
6.16	Herstellung von SDS-Polyacrylamidgelen	93
6.17	Verdünnung verschiedener Proteineluate für den BCA-Assay	95
6.18	Reagenzien für den mizellaren Sphingomyelinase-Assay	96
6.19	Reaktionsansätze für die Messungen zur Enzymkinetik	97
6.20	Reagenzien für den liposomalen Sphingomyelinase-Assay	98

6.21 Zusammensetzung von Liposomen	99
6.22 Reagenzien für den MOSCERDAM-Assay	101
6.23 Zusammensetzung der Agarplatten für die Blau/Weiss-Selektion (GKTXI- Platten)	102
6.24 Zelllinien und Kulturmedien	104
6.25 Puffer zur Herstellung von BSA/ Sphingolipidkomplexen	106

Abkürzungsverzeichnis

AA Acrylamid

AB Antibiotikum

AS Aminosäure

ASAH saure Ceramidase

ASM saure Sphingomyelinase

BIAcore Biomolecular Interaction Analysis

BMP Bis(monoacylglycero)phosphat

bp Basenpaare

BS Butyl-S

BSA bovines Serumalbumin

BV Baculovirus

CAPK Ceramid-aktivierbare Proteinkinase

CAPP Ceramid-aktivierbare Proteinphosphatase

cDNA copy Desoxyribonukleinsäure

CHO chinese hamster ovary

Chol Cholesterol

Con A Concanavalin A

cpm counts per minute

CV column volume

Cys Cystein

DAG Diacylglycerol

DMSO Dimethylsulfoxid

DOPC 1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholin

DPPA 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphat

DS Desalting

E.coli Escherichia coli

ER Endoplasmatisches Reticulum

ERK Map-Kinase ERK Map-Kinase

FKS fötales Kälberserum

fs frame shift

FTIR Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie

Gln Glutamin

Gly Glycin

GM1 GM1 Gangliosid

His Histidin

HSP heat shock protein

IR Infrarot

kb kiloBasen

kDa kiloDalton

IASM lysosomale saure Sphingomyelinase

LB Lennox Broth

LUV large unilamellar vesicle

M6P Mannose-6-phosphat

MQ Mono Q

mRNA messenger Ribonukleinsäure

MW Molkulargewicht

NADPH Nicotiamid-Adenindinukleotid-phosphat

NP Niemann-Pick

NPD Niemann-Pick-disease

NSM neutrale Sphingomyelinase

PAF Plättchenaktivierender Faktor

PAGE Polyacrylamid-Gelelektrophorese

PAP purple acid Phosphatase

PBS phospate buffered saline

PC Phosphatidylcholin

Pen/ Strep Penicillin/ Streptomycin

PI Phosphatidylinositol

pI isoelektrischer Punkt

PKC Proteinkinase C

PLP Pyridoxalphosphat

REA Restenzymaktivität

rpm rounds per minute

RU resonance unit

S1P Sphingosin-1-phosphat

SA Schüttelamplifikation

SAP Sphingolipid-Aktivatorprotein

sASM sekretorische saure Sphingomyelinase

SDS Sodiumdodecylsulfat

Ser Serin

Sf Spodoptera frugiperda

SM Sphingomyelin

SVD singular value decomposition

TNF Tumornecrosefaktor

Tris Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

v/v Volumenprozent

WT Wildtyp

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, Susanne Ficht- Redmer, die vorliegende Dissertation selbstständig erarbeitet und verfasst zu haben. Es wurden keine weiteren Quellen und Hilfsmittel als die angegebenen verwendet.